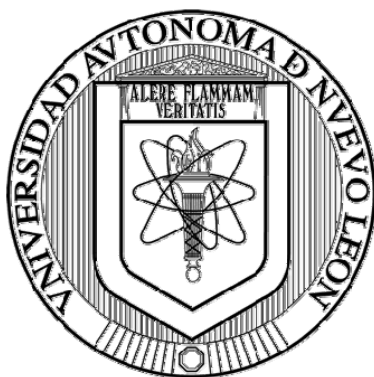


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESCALAMIENTO EN UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS DE  
LA INDUSTRIA MINERA CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL  
PETRÓLEO.

Por

ARTURO SALINAS MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biotecnología.

Octubre, 2008

ESCALAMIENTO EN UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS DE  
LA INDUSTRIA MINERA CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL  
PETRÓLEO.

Comité de tesis

Leticia A. Háuad Marroquín  
Director interno

Hiram Medrano Roldán  
Director externo

Hugo A. Luna Olvera  
Codirectoctor Interno

Jean Claude Revel  
Codirector externo

N. Óscar Soto Cruz  
Asesor

Elena Rustrián Portilla  
Asesor

Katiushka Arévalo Niño  
Asesor

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a:

La Dra. Leticia A. Háuad Marroquín y a el Dr. Hiram Medrano Roldan por la dirección de este trabajo, por sus asesorías y toda la experiencia de diferentes ámbitos transmitida durante este trabajo; además, por todas sus atenciones y la amistad que me han brindado.

A LUISMIN S.A. de C.V. y en especial a la M. en C. Hilda Pérez Andrade por haberme dado la oportunidad de desarrollar un proyecto de investigación con miras de su aplicación a nivel industrial.

Al Prof. Jean Claude Revel por el tiempo invertido en la revisión del escrito y sus valiosas sugerencias, lo que posibilitó la correcta redacción de este documento.

A la Dra. Elena Rustrián Portilla y al Dr. Eric Houbbron por todas sus atenciones y las facilidades prestadas durante las estancias realizadas en su laboratorio.

Al Dr. Javier López Miranda por su invaluable apoyo en la elaboración y estructuración de todos los aspectos matemáticos relacionados en este documento.

A los Drs. N. Oscar Soto Cruz, Katiushka Arévalo Niño y Hugo A. Luna Olvera por el apoyo brindado en todos estos años de investigación.

Al Dr. Roberto Mercado Hernández por sus asesorías en los aspectos estadísticos de esta investigación.

Al M. en C. Segio García Gonzalez por su amistad y todo el apoyo brindado durante el periodo de la realización de mi doctorado.

A mis compañeros y amigos Gerardo R. Hernández Carbajal y Carlos A. Alba Fierro por su ayuda y compañerismo en la realización de esta investigación, además de regresarme la esperanza en los estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca con número de registro 174068

A Lupita y Xóchitl por su apoyo y solidaridad antes, durante y después de esta investigación.

A la mejor persona que he conocido, mi Madre.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN Y ABSTRACT . . . . .	1
2. INTRODUCCIÓN . . . . .	3
3 HIPÓTESIS . . . . .	5
4. OBJETIVOS . . . . .	6
4.1. Objetivo general . . . . .	6
4.2. Objetivos particulares . . . . .	6
5. ANTECEDENTES . . . . .	7
5.1. Biorremediación . . . . .	8
5.2. Biolixiviación en pilas . . . . .	12
5.3. Escalamiento . . . . .	18
5.4. Antecedente inmediato . . . . .	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	23
6.1. Materiales . . . . .	23
6.1.1. Suelos . . . . .	23
6.1.1.1. Suelo 1 . . . . .	23
6.1.1.2. Suelo 2 . . . . .	24
6.1.1.3. Suelo 3 . . . . .	24
6.1.2. Material biológico . . . . .	25
6.1.3. Solución mineral . . . . .	25
6.1.3.1. Composición . . . . .	26
6.1.4. Columnas de Biolixiviación . . . . .	27

6.2. Métodos . . . . .	28
6.2.1. Condiciones de trabajo . . . . .	28
6.2.1.1. Determinación de la densidad de la solución mineral . . . . .	28
6.2.1.2. Determinación de la viscosidad de la solución mineral . . . . .	28
6.2.1.3. Determinación de la fracción vacía . . . . .	29
6.2.1.4. Determinación del tamaño de partícula. . . . .	29
6.2.1.5. Determinación del Número de Reynolds . . . . .	29
6.2.1.6. Modelo Matemático . . . . .	30
6.2.2. Análisis . . . . .	32
6.2.2.1. Análisis mecánico del suelo . . . . .	32
6.2.2.2. Extracción de los hidrocarburos totales de petróleo . . . . .	33
6.2.2.3. Cuantificación de hidrocarburos en base seca . . . . .	33
6.2.2.4. Análisis estadístico . . . . .	33
6.2.2.5. Diseño experimental . . . . .	33
6.3. Protocolo experimental . . . . .	34
6.3.1. Diagrama de flujo . . . . .	34
6.3.2. Fase experimental Suelos 1 y 2 . . . . .	35
6.3.3. Fase experimental Suelo 3 . . . . .	36
 7. RESULTADOS . . . . .	 38
7.1. Características de los suelos contaminados . . . . .	38
7.1.1. Suelo 1(Tayoltita) . . . . .	38
7.1.2. Suelo 2 (Texistepec) . . . . .	39
7.1.3. Suelo 3 (Mezcla de suelos) . . . . .	39
7.2. Solución mineral . . . . .	39
7.2.1. Densidad . . . . .	40
7.2.2. Viscosidad. . . . .	40
7.3. Biodegradación de hidrocarburos . . . . .	40
7.3.1. Suelo 1 . . . . .	40
7.3.2. Suelo 2 . . . . .	41
7.3.3. Suelo 3 . . . . .	41
7.4. Estudio de escalamiento . . . . .	44
7.4.1. Espacios vacíos . . . . .	44
7.4.2. Número de Reynolds . . . . .	44

7.4.3. Degradación de hidrocarburos a diferentes escalas . . . . .	44
7.4.4. Modelo matemático. . . . .	45
7.4.5. Escalamiento . . . . .	47
8. DISCUSIÓN . . . . .	54
9. CONCLUSIONES . . . . .	61
10. LITERATURA CITADA . . . . .	63

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Estado actual de los trabajos científicos sobre la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo a nivel internacional. . . . .	11
II. Sales minerales utilizadas en la elaboración de la solución mineral . . . . .	26
III. Características geométricas de las columnas de lixiviación empleadas en el estudio de escalamiento . . . . .	27
IV. Efecto del factor de escala sobre la biodegradación de hidrocarburos . . . . .	45
V. Propiedades físicas y dinámicas del lecho empacado en las columnas . . . . .	49
VI. Valores de $K_1$ en función de los diámetros y los factores de escala correspondientes . . . . .	52



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Descripción de las relaciones físicas de los microorganismos a la estructura de un agregado de suelo que contiene un contaminante orgánico . . . . .	9
2. Diagrama básico del proceso de biolixiviación en pila . . . . .	12
3. Mecanismos de aglomeración por nucleación . . . . .	15
4. Estructura de los aglomerados . . . . .	15
5. Esquema de un lecho empacado en una columna para la simulación de un proceso de biolixiviación en pilas . . . . .	16
6. Diagrama del equipo utilizado para los experimentos de bioestimulación para la simulación de la técnica de biolixiviación en pila . . . . .	22
7. Concentración residual de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTPs) durante el proceso de biorremediación del suelo originario de la ciudad de Tayoltita municipio de San Dimas, Durango . . . . .	42
8. Concentración residual de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTPs) durante el proceso de biorremediación del suelo originario de la ciudad de Texistepec, Veracruz . . . . .	43

9.	Valores normalizados de los hidrocarburos residuales contra el tiempo de biorremediación . . . . .	46
10.	Concentración de los Hidrocarburos Totales del Petróleo con respecto al tiempo de proceso en la biorremediación, como función de los factores de escala utilizados . . . . .	48
11.	Relación entre el diámetro de partícula del lecho empacado y el flujo volumétrico de la solución lixiviante . . . . .	50
12.	Concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo residuales y tiempo de proceso . . . . .	51
13.	Relación entre los valores de $K_1$ y los factores de escala probados . . . . .	53

## NOMENCLATURA

$\varepsilon$	Fracción vacía
$\mu$	Viscosidad de la solución mineral
$\rho$	Densidad de la solución mineral
A	Área superficial de flujo ( $\text{m}^2$ )
D	Diámetro de la columna (m)
$D_p$	Diámetro de partícula (m)
g	Constante de la aceleración de la gravedad ( $\text{m/s}^2$ )
H	Concentración de los hidrocarburos totales del petróleo (mg/Kg)
$H_0$	Concentración inicial de hidrocarburos (mg/Kg)
HTP's	Hidrocarburos Totales del Petróleo
L	Altura del empaque de la columna.
m	Masa
$P_0$	Presión

$P_L$	Presión de la presión al final de la columna de prueba
$Q$	Velocidad volumétrica a través de la columna ( $m^3/h$ )
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
$V_0$	Velocidad superficial
$V$	Volumen
VVM	Volumen de aire por volumen de medio

## RESUMEN

En los procesos de escalamiento han prevalecido algunas reglas que orientan la ingeniería de bioprocesos, siendo la más representativa el incremento del volumen en un factor de 10 como máximo, manteniendo los criterios geométricos y dinámicos. No obstante, la experiencia ha demostrado que ninguna metodología de escalamiento puede aplicarse con suficiente generalidad ya que las condiciones y necesidades de cada proceso son muy diferentes entre si. Por otro lado, la biotecnología ambiental se presenta como una de las principales herramientas para la resolución de problemas mediante la implementación de tecnologías de biorremediación utilizando principalmente microorganismos que transformen, reduzcan o mineralicen los contaminantes presentes en las áreas afectadas. El objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de la técnica de biolixiviación en pilas en un proceso de biorremediación de suelos de la industria minera y petrolera, así como los factores más representativos para realizar un proceso de escalamiento. Para esto se utilizaron tres tipos de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo y un conjunto de columnas simulando un proceso de biolixiviación con 4 factores de escala (1, 4, 9.5 y 18.5), en las cuales se utilizaron las condiciones de operación obtenidas de acuerdo a la ecuación del Número de Reynolds. Los hidrocarburos residuales en las muestras de suelo fueron analizados de acuerdo a los métodos USEPA 3045c y 9071b. De esta manera se encontró que el proceso de biolixiviación en pilas puede ser utilizado independientemente del tipo de suelos a tratar. Sin embargo, el tipo y la concentración del contaminante influye notablemente en la eficiencia del proceso, así como la cantidad y tipos de microorganismos presentes. En el estudio de escalamiento no se encontraron diferencias significativas entre las tasas de biodegradación de los hidrocarburos de las primeras tres escalas probadas, degradando más de 93% en todos los casos. La combinación de técnicas biotecnológicas tales como la bioestimulación de cepas nativas de suelos contaminados y el proceso denominado como biolixiviación en pila permitió desarrollar un proceso biotecnológico que consiguió altos niveles ( $\approx 90\%$ ) de biodegradación de los contaminantes, así como su escalamiento sin pérdidas significativas ( $< 1\%$ ) en la eficiencia del proceso.

## ABSTRACT

In the scaling processes, some rules which lead the engineering of bioprocess have survived, being the most representative the volume increase in a maximum factor of 10, keeping the geometric and dynamic criteria. Nevertheless, experience has demonstrated that no methodology of scaling can be applied with sufficient generality, due to the different conditions and necessities of each process. Besides, environmental biotechnology is presented as one of the prime tools for solving problems by implementing technologies of bioremediation, mainly using microorganisms to transform, reduce and mineralize pollutants in the affected areas. The first aim of this research was to determine the effectiveness of the heap leaching technique, in a process of soil bioremediation of mining and oil industries; as well as in the most representative factors for carrying out a scaling process. For this, three different types of soil contaminated with oil hydrocarbons, and a set of columns were used. The latter, simulated a heap leaching process with four different scale factors (1, 4, 9.5 and 18.5), and the conditions of operation were obtained with the Reynolds Number. The residual hydrocarbons in the soil samples were analyzed according to the USEPA 3045c and 9071b methods. Thus, it was concluded that the heap leaching technique can be applied regardless of the type of soil. However, the kind and concentration of the pollutant plays a remarkable role in the efficiency of the process, and so do the quantity and kinds of the existing microorganisms. During the scale study, they were not found significant differences between the rates of hydrocarbons biodegradation in the first three samples. More than 93% was degraded in all the cases. The combination of biotechnological techniques, such as biostimulation of contaminated-soil native strains and the process denominated heap leaching, allowed to develop a biotechnological process which reached high levels ( $\approx 90\%$ ) of pollutants biodegradation, as well as their scaling without remarkable losses ( $< 1\%$ ) in the efficiency of the process.

## INTRODUCCIÓN

Como causa del gran deterioro ambiental ocasionado por derrames durante el desarrollo de algunos procesos industriales, tales como la minería y la extracción, refinamiento, almacenamiento y transporte del petróleo, es imprescindible la aplicación de técnicas que disminuyan la concentración o la toxicidad de los contaminantes producidos y/o derramados en los procesos antes mencionados y que al mismo tiempo, sean económicamente aplicables. En cuanto a la industria minera mexicana, para los casos de las minas que tengan más de 15 años de operación se estima que existen alrededor de 500 m<sup>2</sup> de suelo contaminado por cada una. Petróleos Mexicanos reportó en 1991 que unas 130,183 toneladas de derivados del petróleo fueron derramadas en suelos nacionales. Debido a esta situación, es imprescindible el desarrollo de tecnologías para la aplicación de técnicas que disminuyan la concentración y/o la toxicidad de los contaminantes producidos por la industria, y que al mismo tiempo no presenten altos costos de inversión y mantenimiento.

Se han desarrollado una gran variedad de tecnologías físicas, químicas y biológicas para resolver los problemas de contaminación ambiental, pero los costos generalmente elevados en las dos primeras y los tiempos de aplicación en la última de ellas, promueven a los grupos de investigación a seguir buscando alternativas técnicamente viables y económicamente sustentables. La biorremediación puede definirse como la transformación, reducción o mineralización de moléculas orgánicas contaminantes

utilizando organismos vivos tales como, bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas superiores. Los sistemas de biorremediación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos mediante las que se utilizan como fuente de carbono y energía. En general, se necesitará la existencia de determinadas poblaciones de microorganismos autóctonos capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y de energía. A su vez, es necesario que haya un determinado número de aceptores de electrones que oxiden enzimáticamente los carbonos procedentes de los hidrocarburos, así como las condiciones adecuadas de pH, nutrientes, temperatura, humedad, textura y estructura del suelo, y concentración de los contaminantes.

Por otro lado, se ha reportado ampliamente la efectividad de la tecnología de biolixiviación en pilas (Heap Leaching) para la recuperación de metales (oro, plata y cobre, entre otros) a partir de minerales de baja ley, así como la remediación de sitios contaminados con metales. Una consideración que también debe tomarse en cuenta es que la popularidad de dicha técnica en la extracción de metales, se debe a su relativa simplicidad y a que ha demostrado ser un proceso biotecnológico, económico y amigable con el ambiente.

Trabajos reportados a nivel internacional han mostrado que los resultados obtenidos con el uso de fermentaciones en medio sólido aplicados a procesos de biolixiviación, biorremediación, entre otros, han tomado relevancia debido a la poca reproducibilidad de los resultados exitosos obtenidos en el laboratorio. Esto puede deberse a la carencia de conocimiento sobre factores de escala para lechos empacados que permitan incrementar la escala del reactor sin pérdida significativa de la eficiencia del proceso al llevarse a escala industrial, por lo que justifica la importancia de generar información relacionada con este tipo de procesos.

El objetivo de este trabajo fue determinar factores de escala que permitan mantener la eficiencia en un sistema de biorremediación de suelos mediante la determinación de las mejores condiciones de operación del proceso.



## HIPÓTESIS

Controlar variables tales como el tamaño del aglomerado y la velocidad de flujo de recirculación aplicando criterios de similaridad dinámica en un sistema de biolixiviación en pila, permitirá mantener una eficiencia del 99% de biodegradación de los hidrocarburos contaminantes, en un periodo de 15 días.

## OBJETIVOS

### 4.1. General

Realizar un estudio sobre escalamiento en un proceso de biorremediación de suelos de la industria minera y petrolera, contaminados con hidrocarburos del petróleo.

### 4.2. Particulares

- a) Determinar las propiedades físicas del sistema de biolixiviación en pila, tales como: densidad, viscosidad, flujo de recirculación y fracción vacía.
- b) Validar la eficiencia de la técnica de biolixiviación en pilas mediante la comparación de 3 tipos de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.
- c) Determinar las condiciones de proceso a factores de escala de 4, 9.5 y 18.5, a partir de las características de la escala menor, para garantizar la similaridad dinámica, basada en el número de Reynolds.
- d) Desarrollar el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo a las diferentes escalas, para determinar la eficiencia del proceso.
- e) Elaborar una ecuación matemática que sea representativa del proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

## ANTECEDENTES

En la carrera hacia el progreso la sociedad ha sido cegada sobre el efecto de los diferentes desechos asociados a la productividad, el desarrollo tecnológico y el crecimiento poblacional, dando como resultado un problema de contaminación ambiental (Borém *et al.*, 2003; Das y Mukherjee, 2007). Para el tratamiento de estos desechos (en aguas, aire, suelos y sólidos) desde el punto de vista de procesos biológicos su comprensión es fundamental. El conjunto de poblaciones microbianas, en particular, la secuencia metabólica de  $n$  número de poblaciones, son las que conducen a la degradación de un amplio número de compuestos orgánicos en el sitio en cuestión (Vaccari *et al.*, 2006). Así, la biorremediación puede ser definida como un método biológico que involucra la transformación o mineralización de contaminantes a compuestos menos tóxicos de mayor disponibilidad biológica, o bien, compuestos más tóxicos pero menos biodisponibles (Evans y Furlong, 2003; Von der Weid *et al.*, 2007). Así, se puede observar que la biotecnología ambiental se presenta como la principal herramienta para la resolución de problemas mediante la implementación de tecnologías de biorremediación utilizando principalmente microorganismos (Atlas, 1981; Alexander, 1999; Fritsche y Hofrichter, 2005; Viñas-Canals, 2005).

### 5.1. Biorremediación

Una amplia variedad de técnicas pueden ser utilizadas para el tratamiento de sitios contaminados. El objetivo primordial de todo proceso de biorremediación es la eliminación o, al menos, la reducción significativa de los contaminantes y así acelerar el proceso de degradación natural que generalmente se lleva a cabo mediante la intemperación y la degradación de los contaminantes por la microbiota autóctona del sitio en el transcurso de los años.

Los métodos de remediación pueden ser clasificados de acuerdo al lugar donde se desarrollen al igual que por los diferentes aspectos de proceso. Así, se clasifican como procesos *ex situ* e *in situ*, además de físicos, químicos y biológicos (Koning *et al.*, 2005). En general, la aceptación de los procesos biológicos como estrategias de limpieza se ha debido a los altos (> 90%) niveles de remediación alcanzados, el hecho de que generalmente no generan residuos tóxicos, así como su competitividad en relación a los costos de inversión comparado con los procesos no biológicos (Blackburn and Hafker, 1993; Semple *et al.*, 2001; Franzetti *et al.*, 2008).

En el caso de los procesos biológicos, generalmente se utilizan microorganismos aerobios, los cuales pueden ser o no ser autóctonos, y suelen clasificarse en 3 grandes grupos (Hutchinson *et al.*, 2001 y Ryan, 1991):

- Biorremediación *ex situ*.
  - a) Biorremediación en Fase sólida.
  - b) Biorremediación en lechos escurridos.
- Biorremediación *in situ*.

El éxito de cualquier proceso de biorremediación que se desarrolle, está determinado por una gran cantidad de factores (Figura 1) que interactúan de manera conjunta tales como los: procesos químicos (reacciones de hidrólisis, oxidación, reducción, fotólisis); físicos o de transporte (sorción, dispersión, difusión, volatilización y solubilización); y biológicos (biodegradación, biotransformación y toxicidad). La consideración de estos factores permitirá dilucidar cual será la mejor técnica de biorremediación de acuerdo a las características particulares de cada lugar (Van Deuren *et al.*, 1997; Volke y Velasco, 2002; Prince, 2003).

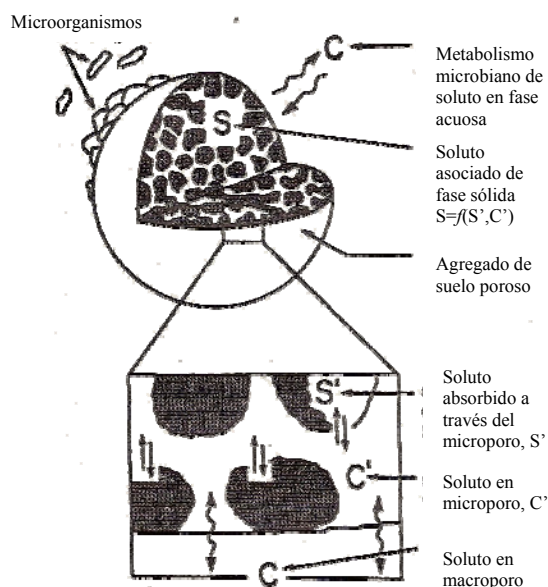


Figura 1. Descripción de las relaciones físicas de los microorganismos a la estructura de un agregado de suelo que contiene un contaminante orgánico (Morra, 1998).

El aprovechamiento de las habilidades bioquímicas de los microorganismos es la estrategia actualmente más popular para el tratamiento de suelos y acuíferos contaminados. Es decir, las interacciones microbianas son de vital importancia para el

proceso de degradación de un compuesto. La mayoría de las ocasiones los microorganismos no trabajan solos, sino en conjunto (consorcios microbianos), esto es, a través de metabolismos secuenciados que comienzan en un microorganismo y continua la degradación en otros (Liu y Suflita, 1993; Semple *et al.*, 2001; Wackett y Hershberger, 2001).

Aunque el potencial de los microorganismos para degradar hidrocarburos se conoce desde hace más de 100 años, la aplicación técnica de este conocimiento no se remonta a más de 20 años en el pasado, y en este breve periodo de tiempo, la remediación biológica de suelos ha sido desarrollada con grandes esfuerzos de investigación e innovación. Actualmente, es una de las tecnologías más ampliamente utilizadas a nivel internacional, en especial la biorremediación en pilas debido a su relativa simplicidad tecnológica y sus bajos costos de inversión y manutención (Schulz-Berendt, 2005). Aun considerando todo lo anterior, la biorremediación no puede considerarse la panacea ya que su uso depende de una gran variedad de factores tales como el tipo, la concentración y la biodisponibilidad de los contaminantes, ya sean orgánicos o inorgánicos, la presencia o ausencia de nutrientes y las características particulares del sitio donde se localice la contaminación (Hamdi *et al.*, 2007; Mohanty y Mukherji, 2008).

Actualmente existen una amplia cantidad de reportes a nivel internacional referente a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo tales como los de Jørgensen *et al.*, 2000; Turlough, 2001; Boopathy, 2003; Kuyukina *et al.*, 2003; Sabaté *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2006; entre otros. La siguiente tabla muestra una revisión de los trabajos científicos más representativos en el ámbito científico de la biorremediación de suelos a nivel internacional.

TABLA I

Estado actual de los trabajos científicos sobre la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo a nivel internacional.

<b>Trabajos Reportados</b>	<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Efectividad</b>	<b>Tiempo</b>
Compost Soil Piles for Treatment of Oil-Contaminated Soil	R. Al-Daher, et al.	2001	Hidrocarburos policíclicos aromáticos	59 %	8 meses
Biodegradation of HMX-Contaminated Soil Using Soil Slurry Reactors	Ramajaraj Boopathy	2001	Ciclotetrametile-neteranitramina (HMX)	97%	4 meses
Co-Composting of Residual Fuel Contamination in Soil	Turlough F. Guerin, et al.	2001	Hidrocarburos totales de petróleo (htp's)	95 %	6 meses
Enhaced Biodegradation	Laleh Yerushalmi, et al.	2003	htp's	81 %	1.5 meses
Laboratory-scale bioremediation of-oil contaminated soil of Kuwait	Yung-Hoon Cho, et al.	1997	aceite	33%	10 meses
Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles	K.S. Jorgensen, et al.	1999	htp's	71%	5 meses
Laboratory.scale bioremediation on hydrocarbon-contaminated soils	J. Sabaté. et al	2003	htp's	46%	12 meses
A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site	B.K. Gogoi, et al	2003	htp's	75%	12 meses
Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo mediante el uso de la técnica de Heap Leaching	Salinas-Martínez et al	2004	htp's	99%	0.5 meses

## 5.2. Biolixiviación en pilas (Heap Leaching)

La técnica de biolixiviación en pilas es un proceso alternativo utilizado principalmente para la extracción de oro, plata, cobre, níquel y uranio en minerales de baja ley, donde otros métodos de extracción no serían redituables. En esencia, el proceso de biolixiviación en pila es relativamente simple (Figura 2). Este involucra la extracción del mineral para ser posteriormente molido hasta un tamaño lo suficientemente grueso para obtener una buena permeabilidad en la pila, pero lo suficientemente fino para dejar expuesto el mineral de interés a la solución lixiviante. Después de la molienda, el material es apilado en una superficie impermeable previamente preparada (impermeable y con 5° de inclinación). La solución lixiviante (ya sea con una suspensión microbiana o bien, una solución nutritiva que estimule a las cepas presentes en el mineral en cuestión) es homogéneamente distribuida en la superficie de la pila mediante aspersión o bombeo, así, conforme la solución se va infiltrando en la pila, libera los compuestos de interés. A la solución colectada del escurrimiento de la base de la pila se le llama “licor madre” y se procesa para recuperar los metales de interés y recircularla nuevamente (Johnson, 1985; Cifuentes, 1998; Pyper *et al.*, 1999; O’Kane Consultants Inc., 2000).

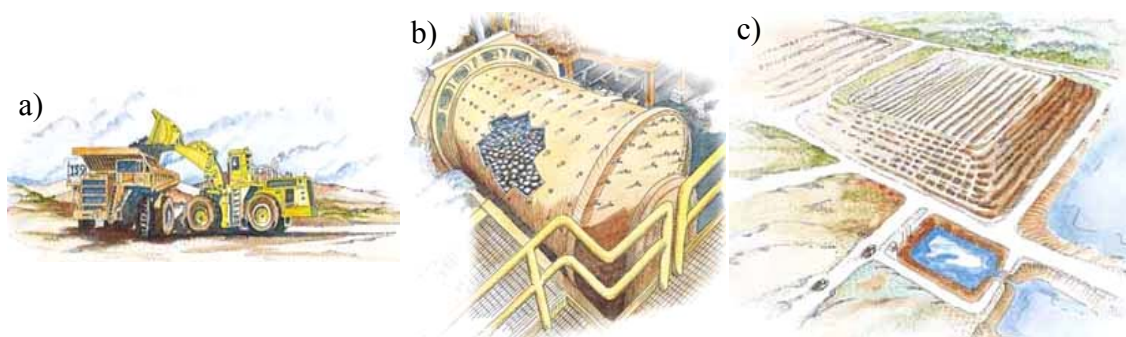


Figura 2. Diagrama básico del proceso de biolixiviación en pila. a) extracción y transporte del mineral, b) reducción del tamaño de partícula, c) montado de una pila para la biolixiviación de metales (Newmont mining corporation, 2006).



Las principales ventajas de la utilización de la técnica de biolixiviación en pilas en la recuperación de metales comparados con los otros procesos de extracción son su relativa simplicidad, condiciones de operación sencillas, bajo costo de inversión, bajo consumo de energía y que es amigable al ambiente (Brombacher *et al.*, 1998; Acevedo, 2000).

El objetivo primordial de esta técnica es liberar un material contenido en una matriz y puede darse de dos maneras:

1. Donde la solución lixivante es la que directamente actúa sobre la matriz liberando el compuesto de interés.
2. Cuando una solución nutritiva estimula el crecimiento de los microorganismos autóctonos del material a tratar y estos, a su vez, los utilicen junto con los inmersos en la matriz para sus procesos metabólicos (Olson *et al.*, 2003).

Típicamente, durante el proceso de biolixiviación se presenta un fenómeno llamado segregación, que consiste en la acumulación de partículas del mismo tamaño en ciertas zonas de la pila. Estas partículas (de menor tamaño), se depositan en las partes bajas del lecho provocando canalizaciones y, por lo tanto, una saturación no homogénea en la pila (McClelland *et al.*, 1983; O’Kane Consultants Inc., 2000; Muezzinoğlu, 2003). Usualmente, para lechos porosos y los fenómenos de transferencia de masa asociados a ellos, se consideran como las principales propiedades a la porosidad del lecho y a la difusión intrapartícula (Mota *et al.*, 1999). Así, antes de comenzar cualquier estudio debe considerarse la permeabilidad del material a tratar, ya que, cuando éste tiene una permeabilidad baja, el flujo con el que la solución desciende entre las partículas, es muy lento, lo que nos lleva a un proceso demasiado largo y, por lo tanto, económicamente incosteable (Velarde, 2005). Varios autores (Acevedo 2002; Muezzinoğlu, 2003; Olson *et al.*, 2003; Bouffard y Dixon, 2004) coinciden en que el éxito de los procesos de biolixiviación se consigue mediante un flujo volumétrico adecuado y un tamaño de

partícula homogéneo. Para solucionar este tipo de problemas se ha implementado un pretratamiento de las partículas llamado aglomeración.

La aglomeración puede ser descrita como la consolidación de partículas sólidas por medios mecánicos (sin utilización de moldes o extrusores). Durante el proceso de aglomeración, las partículas están sujetas a un proceso continuo de golpes con las partículas contiguas, y estos choques son probablemente la causa de que se unan unas con otras formando partículas de mayor tamaño (Perry y Chilton, 1984). Al mismo tiempo, los mismos golpes interpartícula con el contenedor pueden contribuir a la desintegración de los mismos aglomerados. Únicamente cuando la proporción de unión es mayor que la de desintegración, el tamaño de los aglomerados se incrementa (Velarde, 2005; Degreuve *et al.*, 2006). Los mecanismos por los cuales se forman los aglomerados son mostrados en las Figuras 3 y 4. Finalmente, la calidad de los aglomerados, ésta depende de las características establecidas para cada proceso, pero en términos generales, se puede definir por la uniformidad en el tamaño, el contenido de la humedad inmediato al término de la aglomeración, su textura y porosidad (Bouffard, 2005).

Al conjunto de partículas (de suelo o mineral) aglomeradas e interconectadas por una serie de espacios vacíos, dispuestos en una matriz, se le llama lecho poroso. El proceso industrial de biolixiviación en pilas es en el que una solución lixivante pasa a través de un medio poroso con el objetivo de llevar a cabo una serie de reacciones bioquímicas que liberen los compuestos de interés. Las diferentes formas y tamaños de poros en esta interconexión, permiten el paso de los fluidos a través de la matriz porosa, y que, debido a las irregularidades de la forma y el tamaño de las partículas, la solución lixivante es dividida en dos partes, la primera que continua el flujo entre las partículas por gravedad, y la segunda, que queda atrapada en los poros (entre las paredes de cada partícula aglomerada) y en esta parte del proceso es donde la lixiviación (como procesos de transferencia de masa) es llevada a cabo (Decker y Tyler, 1999; Thiel y Smith, 2004; Sheikhzadeh *et al.*, 2005).

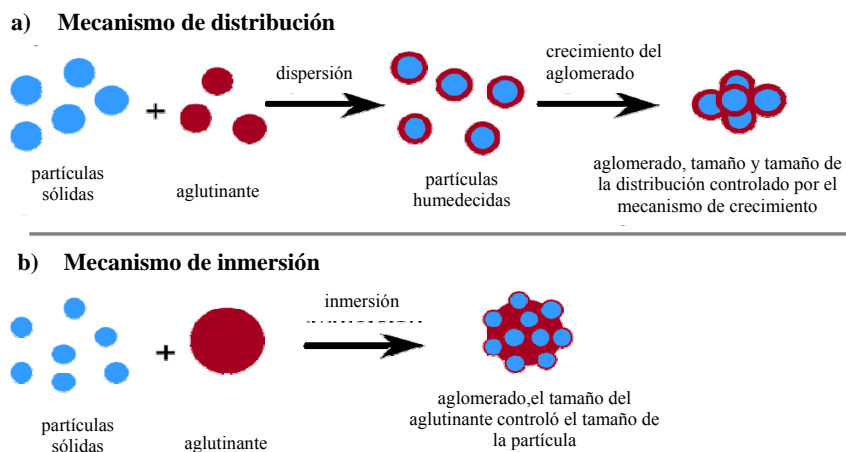


Figura 3. Mecanismos de aglomeración por nucleación: a) distribución; b) Inmersión. Las propiedades del aglomerado dependen generalmente del modo de nucleación y crecimiento (Mort, 2005).

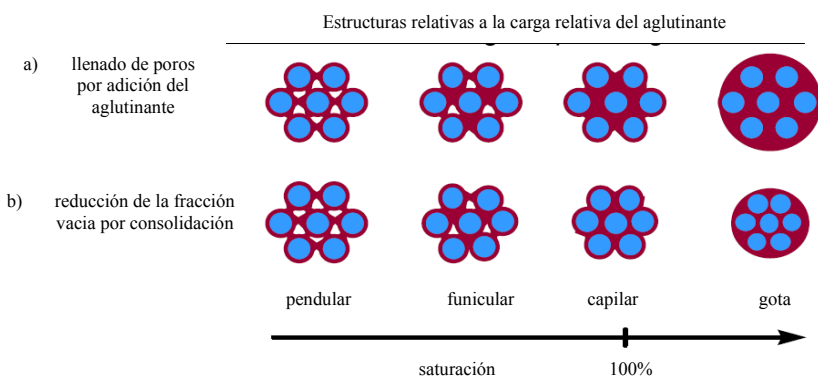


Figura 4. La estructura de los aglomerados involucra el enlace de líquidos móviles. La saturación se incrementa por: a) adición del líquido de enlace y/o b) consolidación del aglomerado (Mort, 2005).

Para estudiar la técnica de biolixiviación en pilas a nivel piloto, se pueden usar dos métodos; uno es empleando bandejas para simular una pequeña pila, y otra, es el uso de

columnas. Según lo reportado en la mayoría de los artículos de investigación y reportes industriales, la segunda opción es la más utilizada (Barrett, *et al.*, 1993; Hanson *et al.*, 1993; Porro *et al.*, 1993; Bouffard y Dixon, 1998; Medrano-Roldán y Galán-Wong, 2000; Lin y Luong, 2004) .

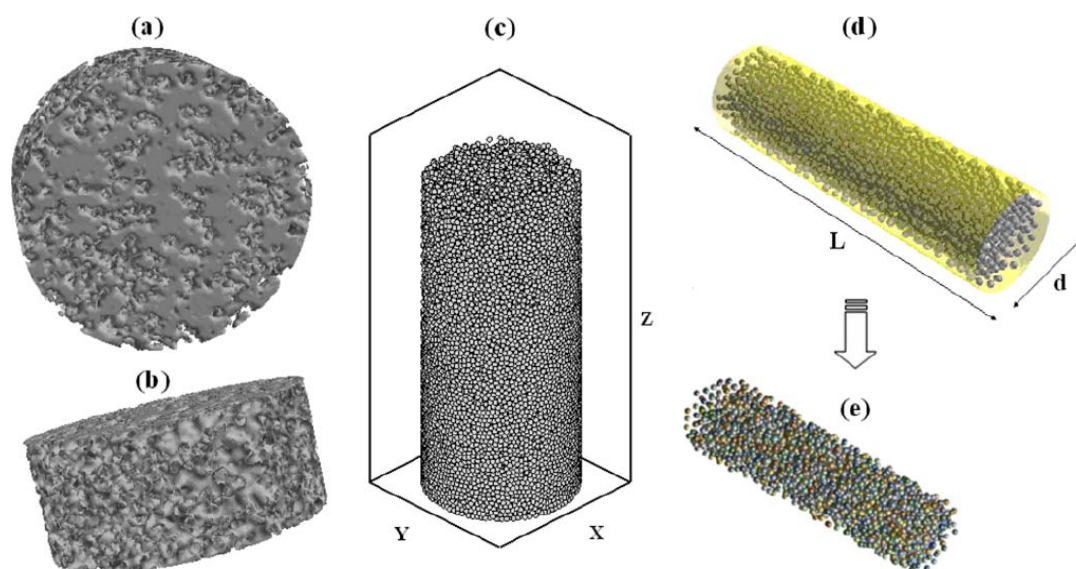


Figura 5. Esquema de un lecho empacado en una columna para la simulación de un proceso de biolixiviación en pilas. Los incisos a y b muestran una representación de la fracción vacía de un lecho empacado con un arreglo irregular (mostrado en el inciso c) Los incisos d y e muestran la configuración de las partículas (Mousavi *et al.*, 2006).

La simulación del proceso de biolixiviación en pila a escala piloto, consiste en aglomerar el material a tratar, en pequeños tambores rotatorios, empacar el material pretratado en un reactor de geometría cilíndrica o rectangular y comenzar el bombeo de la solución lixivante desde la parte superior de la columna, donde la solución comienza a fluir por los espacios vacíos más pequeños del lecho, una vez que se encuentran inundados, sigue con los espacios más grandes, como formando pequeños ríos que

corren alrededor de las partículas (Bosecker, 1997; Sheikhzadeh *et al.*, 2005; Finžgar y Leštan, 2006). La cantidad de espacio libre depende de las variables siguientes:

- Porosidad de la capa
- Diámetro de las partículas
- Esfericidad o forma de las partículas
- Orientación o disposición del empaquetado de las partículas
- Rugosidad de las partículas

Finalmente, se colecta la solución en la parte inferior de la columna. De acuerdo al objetivo del experimento, se debe contar con un método adecuado para evaluar su progreso, comúnmente se mide la masa del contaminante a remover (Thiel y Smith, 2004; Majdi *et al.*, 2007).

Así pues, los procesos de simulación a escala laboratorio y piloto, fungen principalmente como herramientas que ayudan en el establecimiento de parámetros operativos que proporcionan información confiable para el diseño de modelos a partir de conceptos geológicos, biológicos y, en el caso de la biolixiviación en pilas, de funcionamiento hidráulico, que permitan su aplicación a un nivel comercial (Barrett, *et al.*, 1993, Orrantia-Borunda *et al.*, 2000).

### 5.3. Escalamiento

El escalamiento se define como el conjunto de técnicas que conducen a la predicción, con un riesgo mínimo, de las condiciones bajo las que debe de operar un equipo a cualquier otra escala, mayor o menor, con base a resultados de los datos experimentales obtenidos en laboratorio o planta piloto. El objetivo del escalamiento es reproducir los resultados de la escala disponible (laboratorio y/o piloto) a la que se pretende llevar (comercial y/o industrial), respetando un factor de escala y un principio de similitud. La ausencia de criterios científicos de escalamiento para las fermentaciones en medio sólido limita considerablemente el cambio de escala (Aiba *et al.*, 1965; Saucedo-Castaneda *et al.*, 1996).

Existen varios criterios para escalamiento de procesos biotecnológicos, basados en la similitud, con el fin de buscar la reproducción de los resultados obtenidos en laboratorio y planta piloto. Los principales se basan en la similitud geométrica, dinámica, térmica y bioquímica (Saucedo-Castaneda *et al.*, 1996; Medrano-Roldán y Galan-Wong, 2003), desafortunadamente resulta prácticamente imposible satisfacer, simultáneamente, todos los principios de similitud, por lo que deben elegirse aquellos parámetros que, en conjunto, definan lo más ampliamente el sistema con el que se va a trabajar. Por lo general, se acostumbra trabajar la similaridad geométrica en conjunto con la similaridad dinámica (Medrano-Roldán *et al.*, 2004; Zlokarnik, 2001; Pandey *et al.*, 2000).

La representación de los fenómenos más característicos del proceso desarrollado se lleva a cabo mediante la estructuración de ecuaciones o modelos matemáticos y así, facilitar la implementación de estrategias de control y escalamiento. Dicho procedimiento se inicia con la definición de las variables, seguido de la formulación de la hipótesis y de esta manera comprobar cada una de ellas experimentalmente, para

después, traducirlas en un lenguaje matemático adecuado (Gogoi *et al.*, 2003).

Para el caso de los modelos para la fermentación en medio sólido, además de las clásicas variables como consumo de sustrato y crecimiento microbiano, se presentan otras como la masa de aire, temperatura, disponibilidad de agua y espacio vacío. Pero son pocos los modelos que se han desarrollado y que engloben estas variables, por lo que, las interacciones entre los parámetros físicos y biológicos, aun no se conocen a ciencia cierta (Medrano *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2000 y Saucedo-Castañeda *et al.*, 1996).

#### 5.4. Antecedente inmediato

Como resultado de la Auditoria Ambiental realizada en la Unidad Minera San Antonio, Industrias LUISMIN S.A. de C. V., en el año de 1995, detectó suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo (diesel, aceites y grasas), en diferentes áreas operativas. Posteriormente, a través del Departamento de Ingeniería Ambiental y Seguridad de esta empresa, en coordinación con el Laboratorio de Biotecnología de Desarrollos Mineros del Centro, S. A. de C. V., se inició una investigación biotecnológica relacionada con la biorremediación de los suelos contaminados antes mencionados. Se obtuvo aproximadamente un 85% de biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo en 30 días y hasta un 95% en 1.5 años, a partir de métodos biotecnológicos (bioaumentación, bioestimulación, composteo y fitorremediación) en condiciones de temperatura y humedad controladas (Flores-Tavizón, 1998).

Los análisis realizados al suelo problema, indican que la concentración total de hidrocarburos del petróleo presentes en el suelo es aproximadamente de 60,000 mg de hidrocarburo/ Kg de suelo. (Reporte del Laboratorio Earth Tech México, S.A. de C.V. 2002). En la Norma Oficial Mexicana (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003), se establece el límite máximo permisible de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos. Para suelos ubicados en zonas de tipo industrial, contaminados con diesel y productos aceitosos el límite máximo permisible es de 2,000 mg/Kg, lo que indica que el nivel de contaminación sobrepasaba la norma establecida, por lo que, las investigaciones para solventar el problema siguieron en curso.

En el año 2002, se optó por trabajar de manera conjunta con la Unidad de Alimentos y Biotecnología Industrial del Instituto Tecnológico de Durango para resolver el problema de contaminación de suelos por hidrocarburos. El primer paso fue realizar un aislamiento de microorganismos nativos degradadores de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado. En este estudio, los principales microorganismos encontrados durante el aislamiento, utilizando como única fuente de carbono el diesel, fueron una bacteria perteneciente al género *Flavobacterium*, y un hongo del género *Aspergillus*. Las pruebas de caracterización cinética a nivel matraz realizada a los microorganismos antes mencionados nos muestran que en el caso de *Flavobacterium*, éste fue capaz de degradar un 60% de  $C_{16}H_{34}$  en un periodo de 39 horas y en el de *Aspergillus*, el  $C_{16}H_{34}$  fue degradado a un 40% a los 13 días (De los Santos-Córdova, 2005). A nivel fermentador se demostró que los microorganismos aislados e identificados son capaces de crecer en simbiosis utilizando como fuente de carbono diesel comercial, logrando un porcentaje cercano al 90% (Salcido-Hernández, 2005). Las cepas antes mencionadas, han sido frecuentemente reportadas como microorganismos degradadores de hidrocarburos debido a las características particulares que presentan. En el caso de *Flavobacterium*, ésta exhibe una fuerte ventaja competitiva, debido a que puede tolerar altos niveles de toxicidad de los contaminantes más comunes presentes en los sitios afectados (Whiteley y Bailey, 2000). Por otro lado, *Aspergillus* puede mineralizar los hidrocarburos y

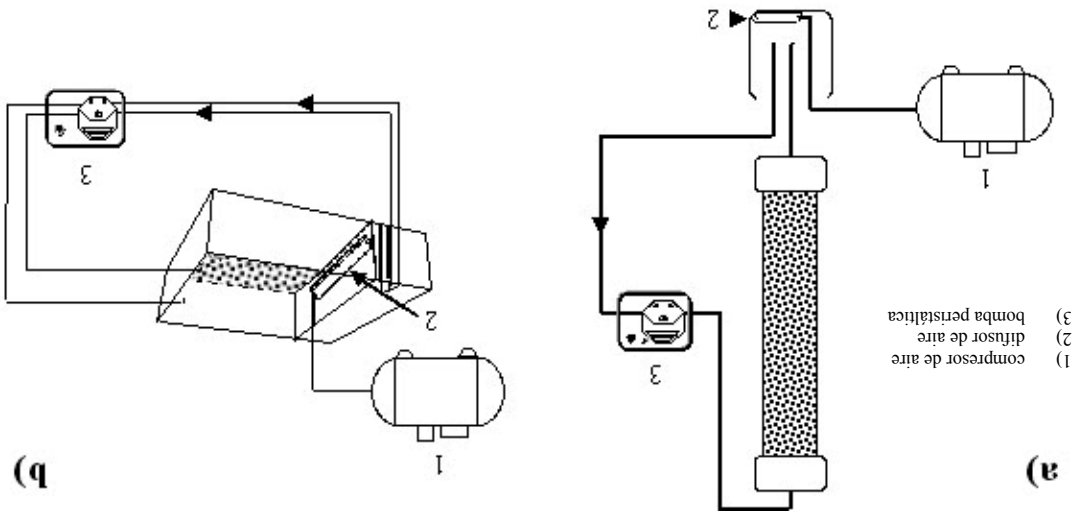


producir metabolitos altamente solubles en agua y de esta manera facilitar la reactividad química, lo cual permite la mineralización de estos compuestos con la ayuda de bacterias nativas de suelos contaminados (Cerniglia, 1997). La presencia de estas cepas, y de otros microorganismos (no caracterizados) observados en las muestras de suelo capaces de utilizar diesel como única fuente de carbono, permitieron visualizar un proceso exitoso de biorremediación de suelos.

En relación con el método con el que se iba a tratar el suelo contaminado, debido su relativa simplicidad, efectividad y eficiencia en la industria extractora de metales, así como por su potencial para su aplicación en otros procesos biotecnológicos, se decidió trabajar con la técnica de biolixiviación en pilas. Para la simulación de esta técnica a escala laboratorio, se emplearon columnas de policarbonato empacadas con el suelo problema (Figura 6). La primera etapa consistió en encontrar las condiciones requeridas para el empaque de las columnas. Para esto, se probaron diferentes mezclas de suelo contaminado con arena para ser sometido a un tratamiento de aglomeración antes de ser empacado. Los hidrocarburos totales degradados en las muestras obtenidas de los diferentes ensayos, fueron cuantificados utilizando cromatografía de gases, de acuerdo a los métodos USEPA 3045c y 9071b. De esta manera, se encontró que la mezcla de suelo/arena que presenta mejores parámetros de operación fue con 2% de arena (Rivera-Rojas, 2005). Los análisis mostraron que con una tasa de recirculación de flujo de 200 mL/h y una aireación de 1 VVM, la biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo alcanzaba niveles de remoción cercanos al 99% (Salinas-Martínez, 2004).

Debido a los resultados obtenidos en el proceso de biolixiviación en pila a nivel laboratorio, se decidió continuar con los estudios que permitiesen utilizar esta técnica, a nivel semicomercial.

Figura 6. Diagrama del equipo utilizado para los experimentos de bioestimulación para la simulación de la técnica de biolixiviación en pila (Salinas-Martínez *et al.*, 2007). Los incisos a y b muestra el esquema básico de la columna y la pila respectivamente.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

#### 6.1.1. Suelos

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon 3 muestras de suelos con diferentes características mecánicas, tipos de hidrocarburos contaminantes y estos a su vez, en diferentes concentraciones dependiendo de su origen.

##### 6.1.1.1. Suelo 1

El suelo problema fue proporcionado por la empresa LUISMIN, S.A. de C.V., Unidad Minera San Antonio, en San Dimas, Tayoltita, Durango. La contaminación del suelo con hidrocarburos tipo combustible (Diesel), fue originada principalmente debido a fugas y/o derrames, fallas de diseño y fracturas en los tanques de almacenamiento, así

como las actividades de mantenimiento a los equipos de la empresa. La empresa realizó el levantamiento de dicho suelo en un área aproximada de 170 m<sup>2</sup>. Una vez recolectado el suelo en tambos metálicos con capacidad de 200 litros, se colocó en el almacén temporal para tratamiento de suelos. Para este experimento, la empresa proporcionó un tambo de los antes mencionados, con una cantidad aproximada de 100 Kg. Como volumen total para los experimentos desarrollados, 80 Kg fueron tomados previa homogeneización. La concentración media de los hidrocarburos fue de 60,000 mg HTPs/Kg de suelo.

#### 6.1.1.2. Suelo 2

Esta muestra de suelo fue colectada por la empresa Petróleos Mexicanos (PEMEX) en la Unidad Minera Texistepec, localizada en el municipio de Texistepec, Ver., de los playones de una represa de diferentes tipos de desechos industriales, donde el drenado de la represa había expuesto zonas contaminadas por hidrocarburos del petróleo, los cuales fueron removidos y confinados. En el área expuesta a dichos contaminantes, se tomó la muestra de suelo cada 20 cm de profundidad hasta completar tres muestras. Las áreas contaminadas de la represa fueron muestreadas en cuatro puntos completamente al azar. El principal tipo de contaminante (concentración > 80%) presente en este suelo, fueron los hidrocarburos del petróleo del tipo grasas y aceites con una concentración media de 40,000 mg HTPs/Kg de suelo.

#### 6.1.1.3. Suelo 3

Este caso particular fue una mezcla de dos condiciones del suelo 1, tratado con biorremediación (40%) y sin tratamiento de biorremediación (40%) y suelo de jardín (20%). El objetivo de realizar esta mezcla de suelos fue el disminuir la concentración original de hidrocarburos, así como el mantener un consorcio microbiano altamente adaptado a los contaminantes presentes. Las concentraciones de los hidrocarburos

contaminantes en cada una de las fracciones fueron: 60,000 mg HTPs/Kg de suelo para el suelo 1 sin tratamiento de biorremediación; 10,000 mg HTPs/Kg de suelo para el suelo 1 tratado con biorremediación; y, 500 mg HTPs/Kg de suelo para el suelo de jardín. La concentración final de hidrocarburos en la mezcla de suelos se ajustó hasta un valor de 50,000 mg HTPs/Kg mediante la adición de hexadecano.

#### 6.1.2. Material biológico

Para los suelos 1 y 3, el consorcio microbiano utilizado durante el proceso de biorremediación fue autóctono, estando constituido, principalmente, por tres cepas bacterianas y cuatro fúngicas, de las cuales, sólo fueron identificadas a nivel de género, en un trabajo previo (De los Santos-Córdova, 2005). Los microorganismos que presentaron las mejores características cinéticas de crecimiento y degradación correspondieron a una bacteria y un hongo, *Flavobacterium* y *Aspergillus*, respectivamente. Tal como en los suelos 1 y 3, en el suelo 2, los microorganismos empleados fueron autóctonos y estuvieron constituidos principalmente por bacterias de las cuales sólo se realizaron observaciones macro y microscópicas más no una identificación.

#### 6.1.3. Solución mineral

Para compensar los requerimientos nutricionales de los diferentes microorganismos involucrados en el desarrollo de este trabajo, se empleó una modificación de un medio de cultivo propuesto por Rennie, 1981.

### 6.1.3.1. Composición

Para la elaboración de la solución mineral a partir del medio propuesto por Rennie (1981), se eliminaron las fuentes de carbono presentes para que los hidrocarburos de cada uno de los suelos se utilizaran como la principal fuente de carbono y energía. Así mismo, sólo se conservaron las sales minerales necesarias para suministrar los nutrientes tales como el nitrógeno, fósforo y azufre, así como los cofactores (magnesio, cloro y hierro) necesarios para la producción de biomasa y enzimas. Su composición final se muestra en la Tabla II.

TABLA II

Sales minerales utilizadas en la elaboración de la solución mineral.

Solución mineral	
Componentes	Concentración
$K_2HPO_4$	1.5 g /L
$KH_2 PO_4$	1.5 g /L
$NH_4NO_3$	2.0 g /L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g /L
NaCl	1.0 g /L
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 16mM + EDTA 18.6 mM.	1.0 mL/L

#### 6.1.4. Columnas de biolixiviación

Para cada uno de los experimentos en este trabajo, se utilizaron columnas de acero galvanizado con características específicas de acuerdo a sus condiciones particulares de trabajo, tal y como se describe en la Tabla III. El factor de escala para cada uno de los experimentos fue determinado mediante una relación entre los volúmenes de la columna base y la columna que poseyera las características deseadas, como se muestra en la ecuación siguiente:

$$\text{Factor de escala} = \frac{V_{\text{Columna experimental}}}{V_{\text{Columna base}}} \quad (1)$$

TABLA III

Características geométricas de las columnas de lixiviación empleadas en el estudio de escalamiento.

Características	Columna				
	1	2	3	4	5
Volumen (cm <sup>3</sup> )	570	644	2,261.87	5,308.64	10,062.91
Diámetro (cm)	4.8	5	7.6	10.1	12.5
Altura (cm)	31.5	32.8	49.86	66.26	82
Factor de escala	1	1.18	4	9.5	18.5
Relación (D/D <sub>p</sub> )	10	10	10	10	10
Tamaño de aglomerado (cm)	0.5	0.5	0.75	1	1.25

## 6.2. Métodos

### 6.2.1. Condiciones de trabajo

#### 6.2.1.1. Determinación de la densidad de la solución mineral

La determinación se realizó mediante la técnica del picnómetro, utilizando un picnómetro marca pyrex de 25 mL y aforándolo con el líquido en cuestión a una temperatura de 25° C. Asumiendo que la densidad es la relación entre la masa y el volumen, se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2)$$

#### 6.2.1.2. Determinación de la viscosidad de la solución mineral

La determinación de viscosidad de la solución mineral se realizó mediante un viscosímetro de Ostwald. Se presidió a introducir en el Brazo del viscosímetro (graduación 100), un volumen de 5 mL de agua destilada a 25 °C cuyo coeficiente de viscosidad es de 0.95 centipoise. Se llevó, por succión, su menisco hasta la marca A y se anotó el tiempo que se necesitó para llegar a la marca B. Esto se repitió con la solución mineral a 25°C; de esta manera se obtienen los datos para substituir en la ecuación siguiente para cada uno de los líquidos:

$$\eta = \frac{\pi r^4 t P}{8 L V} \quad (3)$$



Donde  $r$  es el radio de un tubo delgado de longitud  $L$ , por el que fluye un volumen de líquido  $V$ , en un tiempo  $t$ , bajo una presión  $P$ .

#### 6.2.1.3. Determinación de la fracción vacía

Esta variable se midió volumétricamente al cuantificar la cantidad necesaria de solución mineral necesaria para aforar la columna de trabajo con y sin el suelo problema previamente aglomerado y saturado de solución mineral, y se calculó la fracción hueca como la relación entre el volumen de agua y el volumen total de la columna ( $\varepsilon = V_w/V$ ). Éste procedimiento se realizó para cada uno de los experimentos montados.

#### 6.2.1.4. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño del aglomerado se propuso de acuerdo a la relación sugerida por Geankoplis (1999) para la constitución de un lecho empacado homogéneo (flujo en lechos empacados), con una relación de 1:10 entre el diámetro de la columna y el tamaño de partícula.

#### 6.2.1.5. Determinación del Número de Reynolds

El Número de Reynolds (ecuación 4) se determinó utilizando el flujo volumétrico calculado y los valores de densidad, viscosidad y fracción hueca reportados en los apartados anteriores. El valor encontrado (0.1242) es menor que 10, por tanto, el fluido fluye en régimen laminar (Bird *et al.*, 2002).

$$Re_h = \frac{4}{6} \frac{Dp}{\mu(1-\varepsilon)} \frac{4Qp}{\pi D^2} \quad (4)$$

#### 6.2.1.5. Modelo matemático

Con base en resultados previos, se determinó que la disminución en el proceso de biodegradación de hidrocarburos, depende de su concentración a través del tiempo (ecuación 5).

$$\frac{dH}{dt} = -KH \quad (5)$$

El signo negativo indica que la concentración de los HTPs disminuye con el tiempo de biorremediación. Integrando la ecuación 5 se obtiene:

$$\ln H = -Kt + C_1 \quad (6)$$

La constante de integración se evaluó substituyendo las condiciones iniciales (para  $t = 0$ ,  $H = H_0$ ). El valor de  $C_1$  se substituyó en la ecuación 5 obteniéndose la ecuación 7. Esta muestra que la velocidad de disminución en la concentración de hidrocarburos en el suelo, depende de su concentración inicial ( $H_0$ ) y del tiempo de biorremediación ( $t$ ).

$$H = H_0 e^{-Kt} \quad (7)$$

Con el propósito de hacer ecuaciones adimensionales, el análisis de datos se

realizó utilizando variables normalizadas, observándose un comportamiento similar al indicado por la ecuación 7:

$$H^* = e^{-K_1 t} \quad (8)$$

En esta ecuación,

$$H^* = \frac{H}{H_0} \quad (9)$$

y

$$t^* = \frac{v_0}{Dp} t \quad (10)$$

La sustitución de las ecuaciones 9 y 10 en la ecuación 8 produce:

$$H = H_0 e^{-K_1 \frac{v_0}{Dp} t} \quad (11)$$

Comparando las ecuaciones 7 y 11 muestra que  $K = K_1 \frac{v_0}{Dp}$  y, despejando  $v_0$  de la ecuación de Blake-Kozeny, se obtiene:

$$v_0 = \frac{1}{150} \frac{\rho g D p^2}{\mu} \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon)^2} \quad (12)$$

Substituyendo la ecuación 12 en la 11 se obtiene:

$$H = H_0 e^{-\frac{K_1}{150} \frac{\rho g D p}{\mu} \frac{\varepsilon^3}{(1-\varepsilon)^2}} \quad (13)$$

Esta ecuación muestra el efecto de la geometría de la columna (D), las características del lecho empacado ( $D_p$  y  $\varepsilon$ ) y las propiedades físicas de la solución lixiviante ( $\mu$  y  $\rho$ ) sobre la velocidad de reducción de hidrocarburos contaminantes (HTPs) durante su biorremediación.

### 6.2.2. Análisis

#### 6.2.2.1. Análisis mecánico del suelo

La determinación de cada una de las diferentes fracciones de los suelos se realizó mediante los criterios establecidos por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM 021 RECNAT 2000.

#### 6.2.2.2. Extracción de los hidrocarburos totales de petróleo

La obtención de los hidrocarburos residuales en cada una de las muestras de suelo se realizó mediante una extracción sólido/líquido de acuerdo con el método USEPA 3045c. Así mismo, los hidrocarburos extraídos fueron concentrados, mediante la técnica de eliminación de solvente a presión reducida utilizando un rotavapor Büchi Mod. R – 205 y un baño de calentamiento Büchi Mod. B - 490.

#### 6.2.2.3. Cuantificación de hidrocarburos en base seca

La determinación expresada en base seca de las muestras de suelo con los hidrocarburos totales del petróleo residuales, a se llevó a cabo utilizando el método USEPA 9071b.

#### 6.2.2.4. Análisis estadístico

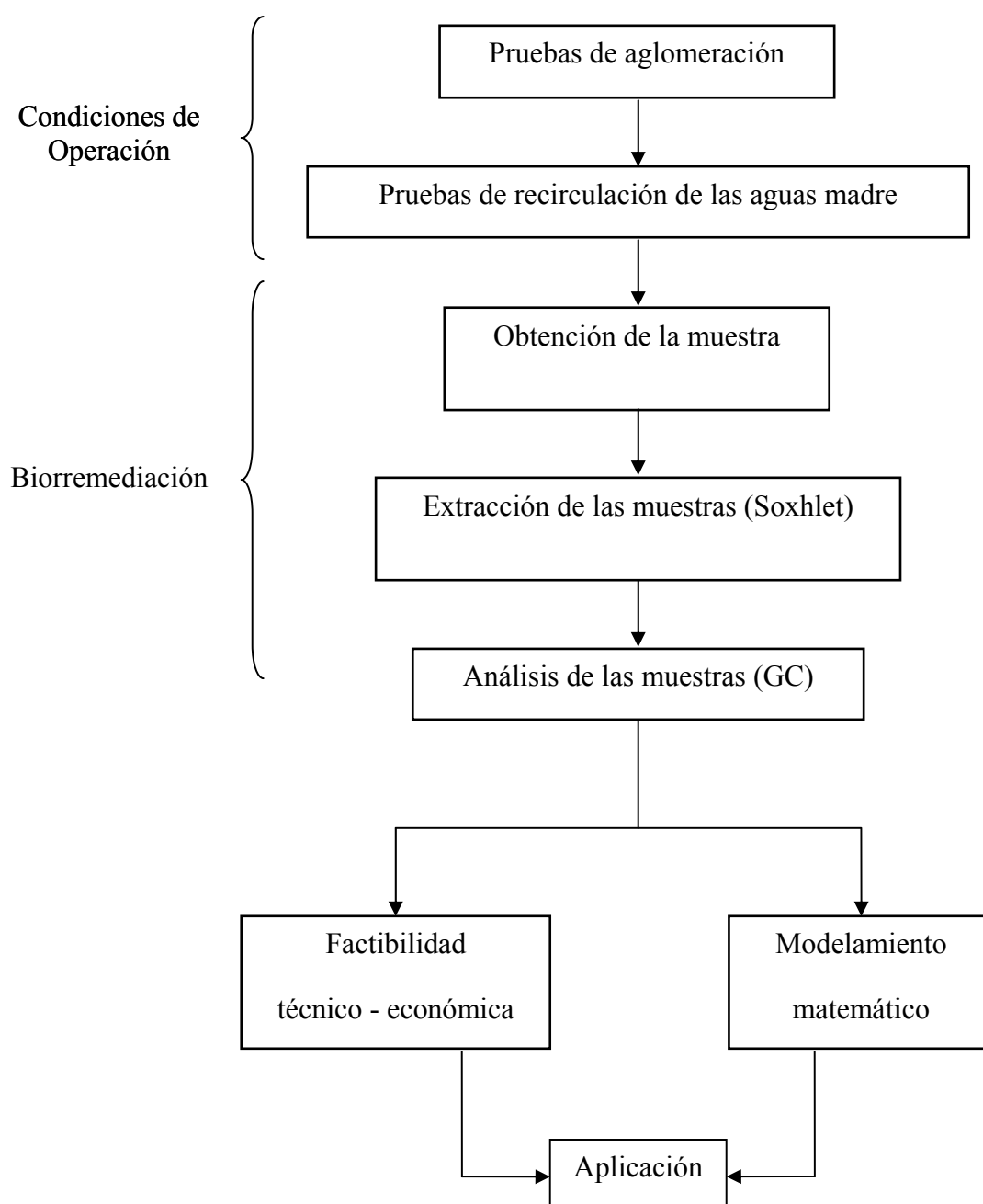
El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el software Statistica V.7.0

#### 6.2.2.5. Diseño experimental

Ese realizó un análisis de varianza de un factor para cada determinación y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para la comparación múltiple de medias.

### 6.3. Protocolo experimental

#### 6.3.1. Diagrama de flujo



### 6.3.2. Fase experimental Suelos 1 y 2

- El suelo fue homogeneizado utilizando un recipiente cilíndrico (30x36 cm) con tapa, mediante movimientos oscilatorios. El proceso se realizó manualmente.
- El suelo, previamente homogeneizado, fue aglomerado de la manera siguiente. Se adicionaron 100 mL de solución mineral por cada kilogramo de suelo en dos tantos de 50 mL llevándola hasta un 37% de saturación; se homogeneizó la humedad mediante movimientos oscilatorios por periodos de 2 minutos hasta completar un total de 10. El aglomerado obtenido en este proceso resultó de un tamaño promedio de 4 – 7 mm y una media de 5 mm.
- El Empaque de los suelos aglomerados se hizo directamente mediante la ayuda de un embudo.
- La solución mineral se recirculó desde frascos ámbar con capacidad de 1 L. Dicha solución fue recirculada utilizando una bomba peristáltica Cole Parmer Instruments L/S con un rango de 6-600 rpm Mod. 7520-40 con dos cabezales tipo Easy Load II L/S Mod. 77200 – 60 y una manguera Tygon® grado combustibles y lubricantes # 13. La bomba fue calibrada a un flujo de 225 mL/h.
- La solución mineral fue aireada por burbujeo a 1VVM mediante el uso de difusores.
- Las muestras para la extracción y cuantificación de los hidrocarburos residuales en el lecho empacado, fueron tomadas de la parte inferior de la columna, tomando una sección transversal de aproximadamente 20 g.
- En caso de no ser procesadas inmediatamente las muestras, éstas se almacenaban en refrigeración (4° C) en bolsas con sello hermético.
- La extracción de los hidrocarburos en las muestras de la mezcla de suelos se realizó con un equipo Soxhlet de acuerdo con las especificaciones del método USEPA 3045c.
- Las muestras extraídas por los métodos antes mencionados fueron concentradas de acuerdo a las características establecidas por el método USEPA 9071b a un volumen aproximado de 10 mL utilizando el método de eliminación de solventes

a presión reducida. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración en tubos de ensaye con capacidad de 13 mL.

### 6.3.2. Fase experimental Suelo 3

- a) Se realizó la mezcla de suelos con las proporciones mencionadas en el apartado 6.1.1.3 manualmente utilizando un tambor rotatorio no motorizado.
- b) La concentración final de hidrocarburos en la mezcla de suelos se efectuó adicionando por aspersión 25 mL de hexadecano por cada kilogramo de la mezcla homogeneizándolo con una pala manual primeramente, seguido por un segundo mezclado en el tambor rotatorio no motorizado.
- c) La aglomeración de la mezcla de suelos se llevó a cabo mediante una saturación del 37% de la mezcla. Para saturarla, se adicionaron 100 mL de solución mineral por cada kilogramo de suelo en dos tantos de 50 mL, después de la adición de cada una de ellas, se homogeneizó la humedad mediante la rotación del tambor por un periodo aproximado de 5-10 minutos. El aglomerado obtenido de la mezcla de suelos, siguiendo los pasos antes mencionados resultó de un tamaño promedio de 5 – 15 mm, los cuales fueron separados utilizando mallas con diferentes tamaños de apertura que correspondían a las necesidades de cada condición experimental.
- d) La mezcla suelos se empacó directamente mediante la ayuda de un embudo sobre la boca superior de cada columna
- e) La solución mineral se recirculó desde contenedores de diferentes capacidades volumétricas acorde con cada uno de los experimentos, utilizando una bomba peristáltica Cole-Parmer Instruments L/S con un rango de 6-600 rpm Mod. 7520-40 con dos cabezales tipo Easy Load II L/S Mod. 77200 – 60 y una manguera Tygon© grado combustibles y lubricantes # 13. La bomba fue calibrada según el flujo requerido para cada experimento.
- f) Para cada condición experimental, la solución mineral fue aireada por



burbujeo mediante un difusor de aire a 1VVM.

- g) Cada 72 horas fueron colectadas las muestras por la parte inferior de la columna, tomando una sección transversal de la base del empaque.
- h) En caso de no ser procesadas inmediatamente las muestras, éstas se almacenaban en refrigeración (4° C) en bolsas con sello hermético.
- i) La extracción de los hidrocarburos en las muestras de la mezcla de suelos se realizó con un equipo Soxhlet de acuerdo con las especificaciones del método USEPA 3045c.
- j) Las muestras extraídas por los métodos antes mencionados fueron concentradas de acuerdo a las características establecidas por el método USEPA 9071b a un volumen aproximado de 10 mL utilizando el método de eliminación de solventes a presión reducida. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración en tubos de ensaye con capacidad de 13 mL.

## RESULTADOS

### 7.1. Características de los suelos contaminados.

La clasificación de cada uno de los suelos utilizados en este estudio se determinó mediante un análisis mecánico de acuerdo a los criterios establecidos por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM 021 RECNAT 2000.

#### 7.1.1. Suelo 1(Tayoltita).

De acuerdo al análisis mecánico realizado a la muestra, se encontraron los siguientes porcentajes para cada una de las fracciones del suelo: arena 58%, arcilla 28% y limo 14%, por lo que su clasificación corresponde al tipo de suelo Franco areno-arcilloso (Cra).

### 7.1.2. Suelo 2 (Texistepec).

La concentración de las fracciones encontradas de 42% de arena, 16% de arcilla y 42% de limo sitúan a este suelo como Franco (C).

### 7.1.3. Suelo 3 (Mezcla de suelos).

El análisis mecánico de esta muestra de suelo permitió encontrar la composición de cada una de sus fracciones: arena 58%, arcilla 17% y limo 24%. Por lo que el suelo 3 queda clasificado como de tipo Franco arenosa (Ca).

## 7.2. Solución mineral

La solución mineral utilizada para la bioestimulación de los microorganismos nativos mostró las siguientes características.

### 7.2.1. Densidad.

El valor registrado para esta medición fue de  $1.012488 \text{ g/cm}^3$ .

### 7.2.2. Viscosidad.

El resultado obtenido por el viscosímetro de Ostwald fue de  $0.0096246 \text{ g/cm} \cdot \text{s}$ .

## 7.3. Biodegradación de hidrocarburos.

### 7.3.1. Suelo 1.

El proceso de biorremediación en este suelo logró eliminar un 96.7% de una concentración inicial de  $61,000 \left( \frac{\text{mg} \cdot \text{HTP}}{\text{Kg} \cdot \text{Suelo}} \right)$  suelo de hidrocarburos contaminantes.

Los resultados obtenidos mediante el uso de las columnas experimentales correspondientes al proceso de biorremediación del suelo 1 se muestran en la Figura 7.

### 7.3.2. Suelo 2.

Para este suelo, con una concentración inicial del  $40,000 \left( \frac{mg \cdot HTP}{Kg \cdot Suelo} \right)$  de hidrocarburos del petróleo, un 84% de los contaminantes presentes fueron degradados biológicamente. Los niveles de hidrocarburo residual biodegradado en los experimentos correspondientes al suelo 2, se muestran en la Figura 8. Cabe mencionar que este suelo presentó una concentración de asfaltenos del 36.16%, los cuales no son considerados para el análisis de biodegradación.

### 7.3.3. Suelo 3

Los resultados obtenidos en los experimentos de degradación de hidrocarburos para este tipo de suelo, se muestran en el apartado 7.4.3.

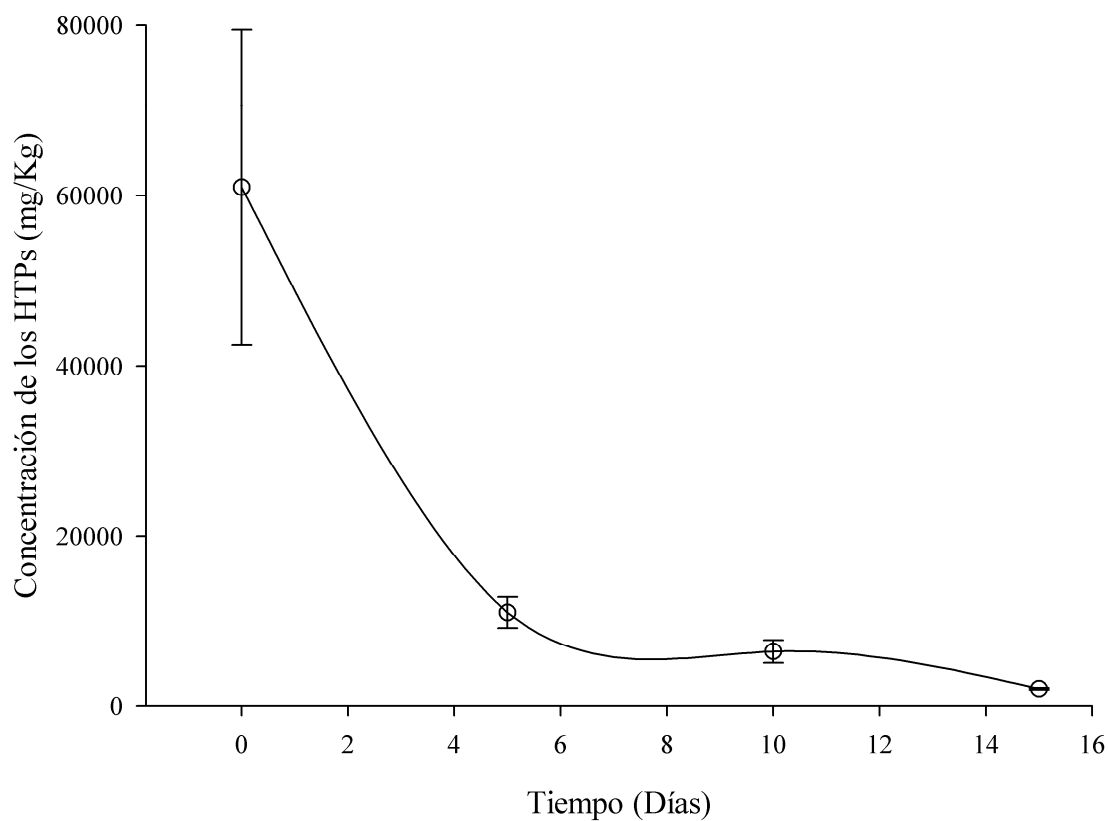


Figura 7. Concentración residual de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTPs) durante el proceso de biorremediación del suelo originario de la ciudad de Tayoltita municipio de San Dimas, Durango (Suelo 1). Los datos constituyen la media de un promedio de tres muestras por cada día muestreado.

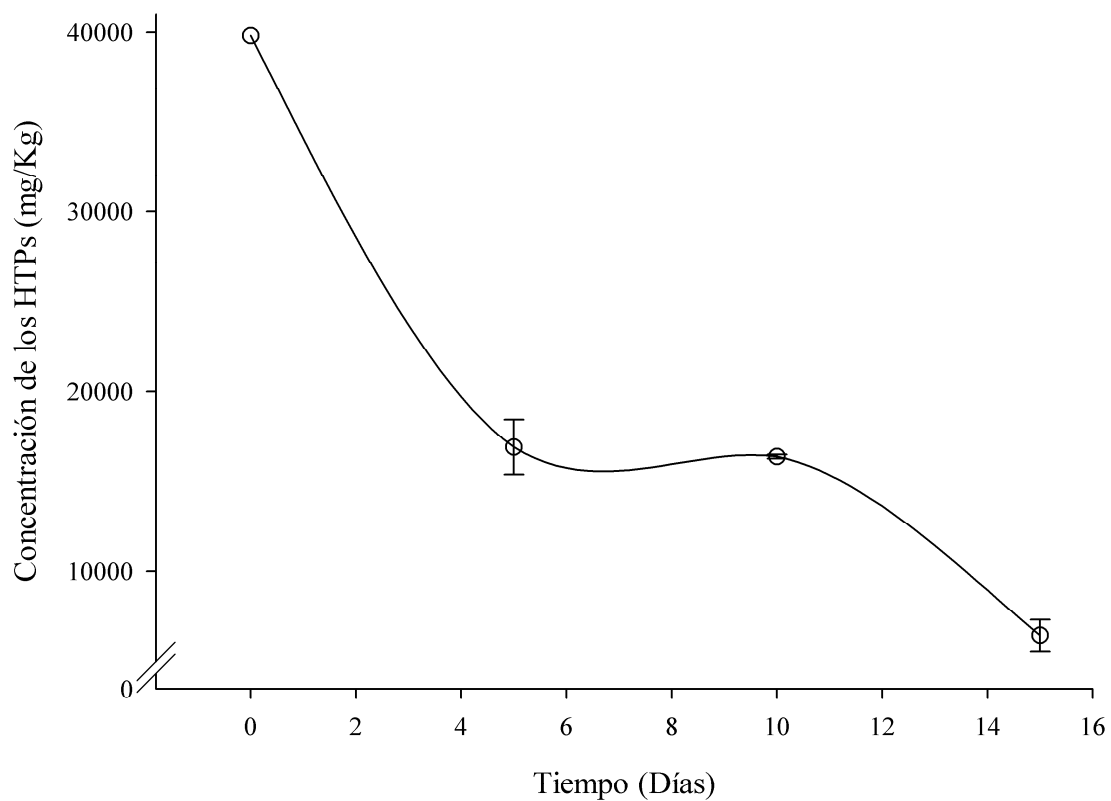


Figura 8. Concentración residual de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTPs) durante el proceso de biorremediación del suelo originario de la ciudad de Texistepec, Veracruz. (Suelo 2). Los datos constituyen la media de un promedio de tres muestras por cada día muestreado.

#### 7.4. Estudio de escalamiento.

##### 7.4.1. Espacios vacíos.

El valor calculado para la fracción hueca en las columnas fue de 0.20.

##### 7.4.2. Número de Reynolds.

Con base en resultados experimentales previos (Salinas Martínez, 2004), se determinó que con una tasa de recirculación de  $200 \text{ mL h}^{-1}$  sobre un lecho empacado con un tamaño de partícula de 5 mm y una relación de altura diámetro en el empaque de 6.45, se obtuvo un valor de Número de Reynolds de 0.2372, el cual se mantuvo constante para cada uno de los estudios de escalamiento.

##### 7.4.3. Degradación de hidrocarburos a diferentes escalas.

El monitoreo de la degradación de hidrocarburos en cada una de las escalas analizadas no mostró diferencias significativas estadísticas (Prueba de  $t_{(0.05,12)}$  para muestras independientes) entre las escalas  $< 10$ . Los resultados se muestra en la Tabla IV.



TABLA IV

Efecto del factor de escala sobre la biodegradación de hidrocarburos

<b>Escala</b>	<b>Contaminante Consumido</b> (mg/Kg)	<b>Tasa específica de biodegradación</b> (mg HTPs / Kg de suelo · día)	<b>Consumo del contaminante (%)</b>
1	47,120 ± 3340	2,618 ± 535	94.2
4	46,827 ± 2152	2,601 ± 20	93.6
9.5	46,667 ± 2220	2,592 ± 149	93.3
18.5	30,580 ± 4028	1,294 ± 1089	61.9

#### 7.4.4. Modelo matemático.

Para validar el modelo matemático algunas columnas fueron empacadas de acuerdo a lo reportado por Salinas-Martínez *et al.*, 2007. Los resultados normalizados se muestran en la Figura 9.

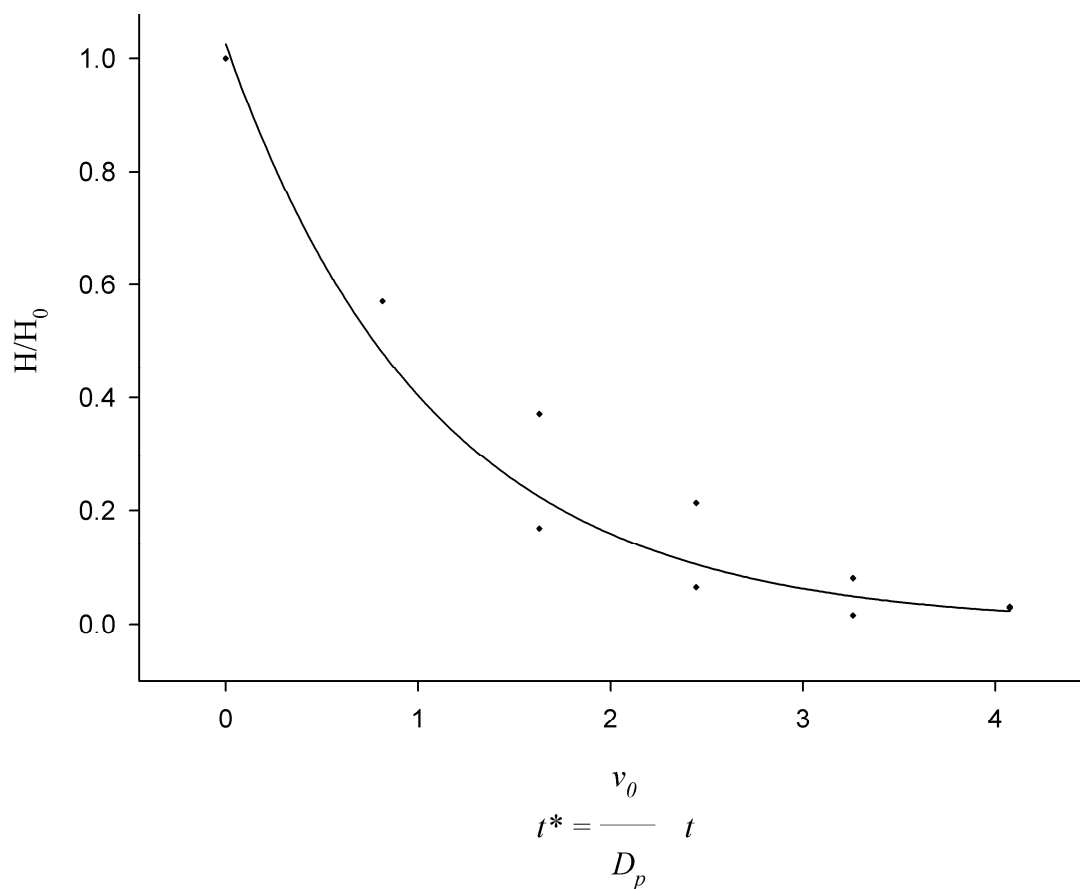


Figura 9. Valores normalizados de los hidrocarburos residuales contra el tiempo de biorremediación. Los datos corresponden a unas columnas empacadas con una relación altura diámetro de 6.4, un diámetro de partícula de 5 mm y una tasa de recirculación de 225 mL/h.

#### 7.4.5. Escalamiento.

En los experimentos realizados para determinar el efecto del factor de escala sobre la biodegradación de los hidrocarburos se mantuvieron constantes tanto el Número de Reynolds como la relación altura-diámetro en las columnas. Se utilizaron reactores con 4 diferentes factores de escala. Se determinó el efecto del diámetro de partícula sobre el flujo volumétrico para cada una de las escalas, así como el efecto del mismo sobre la biorremediación del suelo problema. Los resultados que muestran la concentración residual de los hidrocarburos con respecto al tiempo se indican en la Figura 10.

La velocidad de recirculación fue determinada con un valor del Número de Reynolds constante de 0.1242 según se muestra en la Tabla V. La relación entre el tamaño de partícula y el flujo volumétrico se muestra en la Figura 10. Los valores obtenidos fueron ajustados mediante la ecuación 11 con un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0.9889$ .

$$Dp = 0.2462e^{0.0031Q} \quad (14)$$

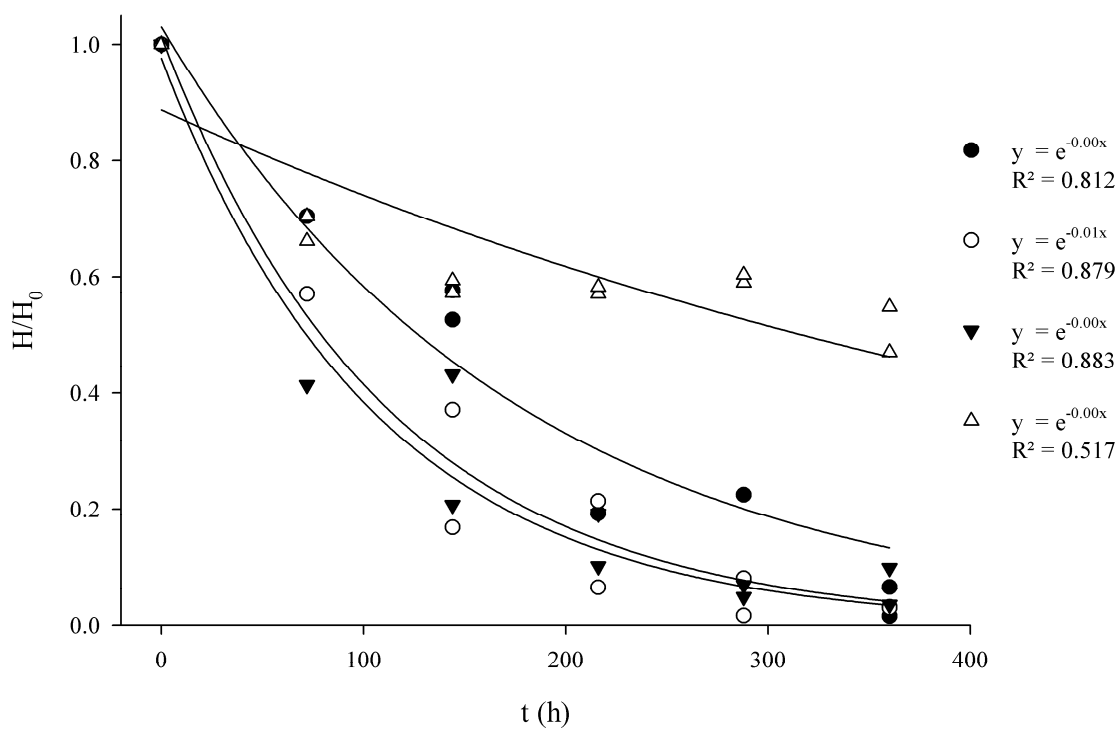


Figura 10. Concentración de los Hidrocarburos Totales del Petróleo con respecto al tiempo de proceso en la biorremediación, como función de los factores de escala utilizados (● 1, ○ 4, ▼ 9.5 y △ 18.5).

TABLA V

Propiedades físicas y dinámicas en el lecho  
empacado en las columnas

Factor de escala	Dp (mm)	Q (mL/h)
1	5	225
4	7	336.5
9.5	10	476.76
18.5	12.5	570.00

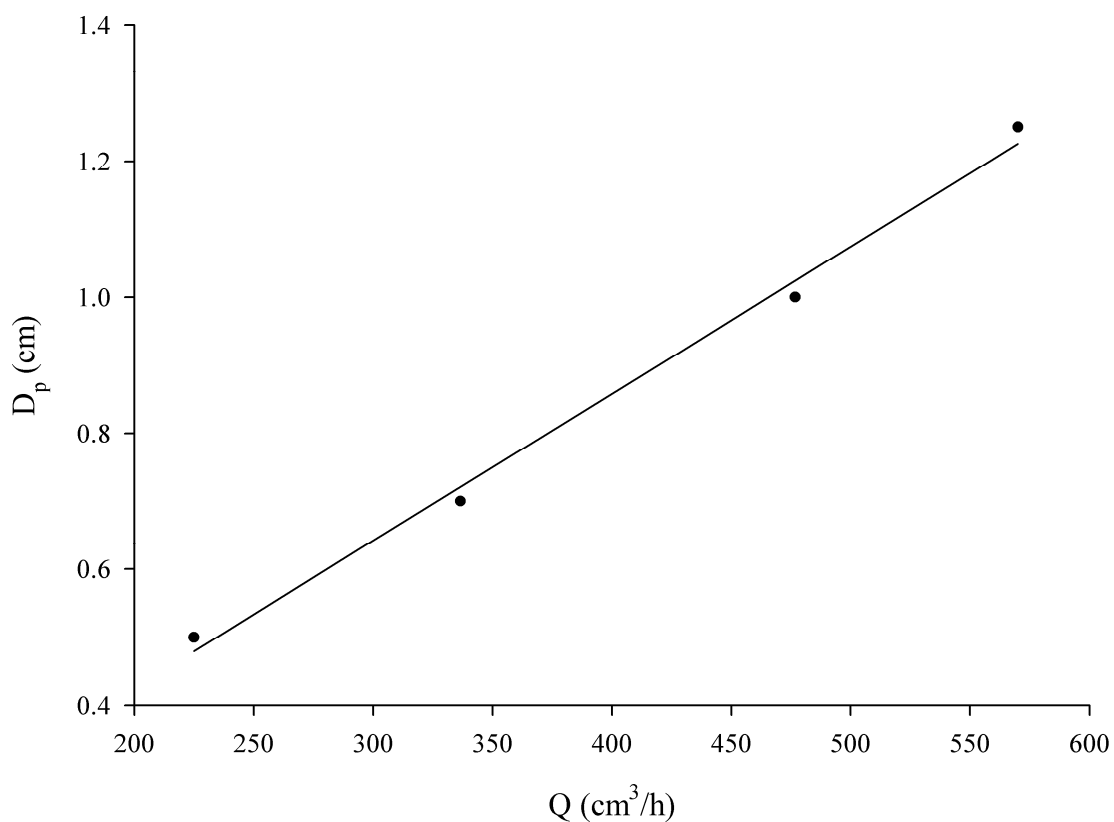


Figura 11. Relación entre el diámetro de partícula del lecho empacado y el flujo volumétrico de la solución lixivante.

Los valores de degradación de hidrocarburos, obtenidos en los experimentos de biorremediación se normalizaron de acuerdo con las ecuaciones 9 y 10. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, éstos incluyen los mostrados en la Figura 10.

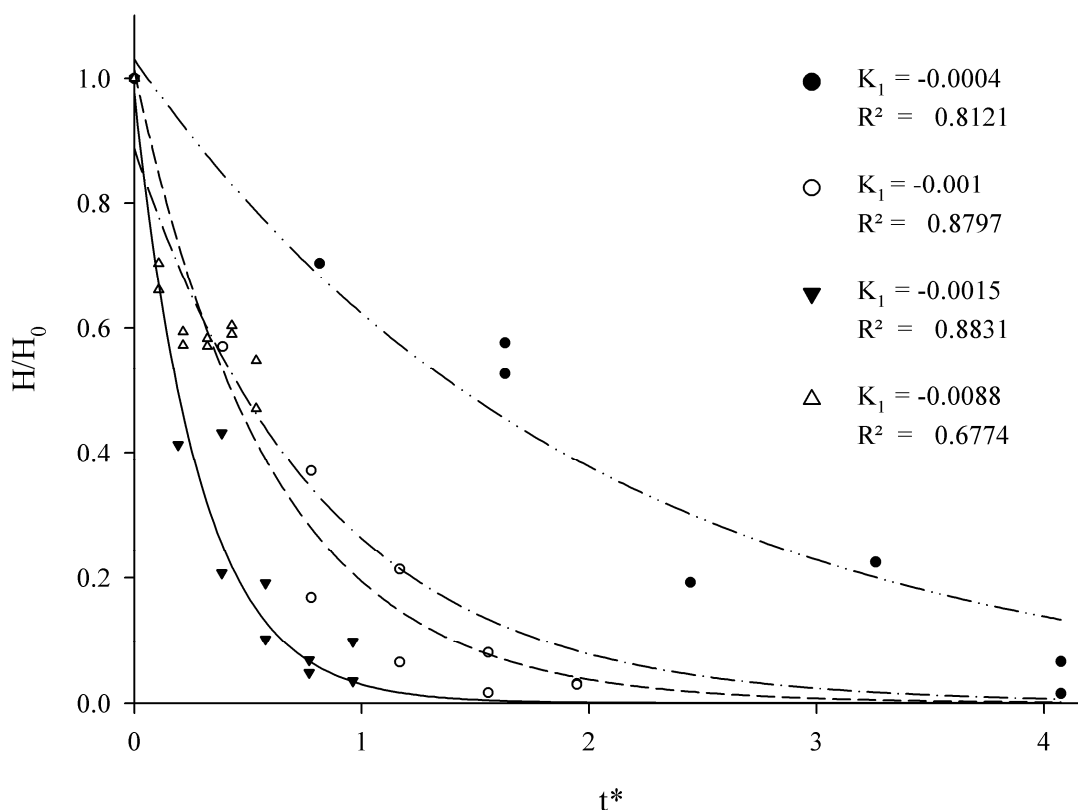


Figura 12. Concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo residuales y tiempo de proceso. En ambos casos los valores fueron normalizados.

La Tabla VI muestra los valores de  $K_1$  utilizados en las columnas de acuerdo tanto con el diámetro de columna, como factor de escala. Los valores de  $K_1$  se graficaron contra el factor de escala (Figura 13) y se observó que en los valores de escala superiores a 10 el comportamiento lineal se pierdepore lo que es posible correlacionar los valores de  $K_1$  con el factor de escala, de manera que el valor de  $K_1$  de la ecuación 13, puede obtenerse de la ecuación 15, en función del factor de escala, dentro del rango estudiado.

$$K_1 = 0.0004e^{\frac{0.166(D/L)}{(D/L)_{originalcolumn}}} \quad (15)$$

TABLA VI

Valores de  $K_1$  en función de los diámetros  
y los factores de escala correspondientes

<b>Factor de</b>		
<b>escala</b>	<b>D (cm)</b>	<b><math>K_1</math></b>
1	5.1200	-0.0004
4	7.6200	-0.001
9.5	10.1600	-0.0015
18.5	12.7	-0.0088



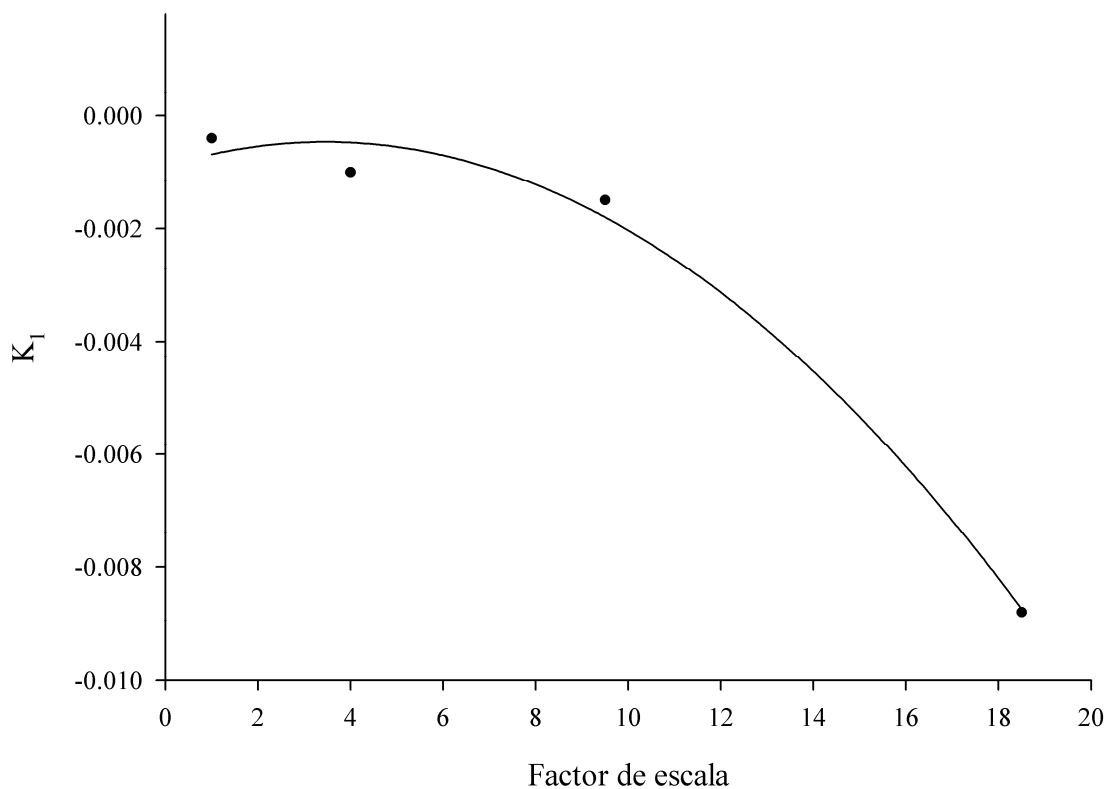


Figura 13. Relación entre los valores de  $K_1$  y los factores de escala probados

Si se comparan las eficiencias de las columnas empleadas (figura 10), se encuentra que existe una notable disminución de la eficiencia de remoción de hidrocarburos para factores de escala  $> 10$ , de manera que, para estos casos, el tiempo de proceso podría incrementarse considerablemente, para lograr una biorremediación equivalente a la obtenida cuando se utilizaron factores de escala menores.

## DISCUSIÓN

La clasificación de los diferentes tipos de suelos utilizados en este trabajo se realizó mediante lo establecido por la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-021-RECNAT-2000, la cual consiste en determinar la composición de las diferentes fracciones de arena, arcilla y limo. Debe observarse que la concentración de arcilla para cada uno de los suelos problema es inferior al 40 % y por lo tanto es considerada como baja (Jaramillo, 2001), lo cual representa una ventaja para que se desarrolle el proceso de biorremediación, ya que, como es sabido, las arcillas poseen una alta capacidad de intercambio y retención de diferentes tipos de compuestos, tales como los hidrocarburos, entre otros tipos de sustancias (Rittmann *et al.*, 2001; Schmidt, 2001 y Gumersindo *et al.*, 2003). De esta manera se asume que las propiedades físicas del suelo no afectaron la biodisponibilidad del contaminante durante su degradación. Es importante considerar que existen otro tipo de factores que pueden influir en la degradación de los contaminantes. En el caso del suelo, su composición química, donde influyen principalmente la concentración de materia orgánica y la presencia de nutrientes (Masak *et al.*, 2003); la composición química del contaminante en cuestión de: solubilidad, grupos funcionales, polaridad, entre otras (Morra, 1998; Christofi e Ivshina, 2002; Stroud *et al.*, 2007), así como las ambientales: localización geográfica, temperatura, precipitación, etc. (Admassu y Korus, 1998; Margesin y Schinner, 2001; Dua *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004; Pala *et al.*, 2006).

Para iniciar o acelerar el proceso de remediación por parte de los microorganismos, es importante proveer las condiciones necesarias para que la comunidad se mantenga metabólicamente activa (Hughes *et al.*, 2002). Los microorganismos nativos de cada uno de los suelos contaminados, fueron inducidos mediante un proceso de bioestimulación, el cual consiste en proporcionar los nutrientes necesarios tales como las sales minerales, el oxígeno, el agua y los cofactores (Edgehill, 1993), creando un ambiente que cubre sus necesidades nutricionales. Se determinaron las propiedades físicas de la solución, a ésta se le determinó la viscosidad y la densidad. Los valores obtenidos ( $0.0096246 \text{ g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$  y  $1.012488 \text{ g.cm}^{-3}$ ) son similares a los del agua destilada a  $25^\circ \text{ C}$  y una atmósfera de presión. Esto le confiere a la solución mineral utilizada las particularidades de un fluido Newtoniano, lo que significa que la posibilidad de problemas hidrodinámicos en el lecho empacado serán bajos en el desarrollo de los experimentos como lo han demostrado algunos autores. (Bujalski, *et al.*, 2003).

La degradación biológica de compuestos hidrocarbonados del tipo combustible, como el Diesel, ha sido ampliamente publicada por muchos autores a nivel internacional (Cunningham y Philp, 2000; Márquez-Rocha, *et al.*, 2000; Saval, 1997; Ausma *et al.*, 2002 y Zytner *et al.*, 2006). Lee *et al.*, 2006, reportaron haber alcanzado cerca del 100% en la degradación de Diesel a una concentración de 0.1% y un 30.5% partiendo de una concentración inicial de 2% mediante la intervención de un solo microorganismo en 7 días; Cohen *et al.*, 2002, encuentra que un consorcio microbiano rizosférico degrada hasta un 50% de una concentración inicial del 4% de Diesel en 19 días, y de esa reducción en la concentración del contaminante, el 10% se debe a pérdidas por evaporación, así mismo, Rubin y Narkis, 2001, en un suelo contaminado con un 13% de Diesel, obtienen cerca del 99% de degradación después de 365 días de tratamiento al utilizar un proceso de bioaumentación en biorreactores. En comparación, los resultados obtenidos de los experimentos realizados con el suelo 1 a una concentración inicial del

6.1% y el suelo 2 con un nivel de contaminación del 4%, la remoción de los hidrocarburos contaminantes fue de un 97% y un 67% respectivamente en 15 días de proceso. Es evidente que estos datos muestran una mayor eficiencia en la degradación de los contaminantes. Para el caso de los resultados con el suelo 2, debe considerarse que el tipo de hidrocarburos con el cual estaba contaminado no pertenecía al tipo combustible como el Diesel sino, que estaba constituido principalmente por grasas y aceites industriales de las minas de azufre del sureste del país. Así, debido al bajo nivel de degradación alcanzado en comparación del obtenido con el suelo 1, se prolongó su tratamiento hasta los 21 días, logrando un 84% en la degradación de los contaminantes hidrocarbonados.

Con base en los experimentos reportados por Salinas-Martínez, en el 2004, se determinaron parámetros tales como el valor del Número de Reynolds, el tamaño de partícula y la relación altura-diámetro del reactor. Así, al mantener constante el Número de Reynolds y la relación altura-diámetro, se determinaron las condiciones de operación para cada una de las escalas probadas.

Los resultados obtenidos durante los experimentos de biodegradación de hidrocarburos con el suelo 3 (Tabla 3) muestran que en los factores de escala  $< 10$ , la remoción de los hidrocarburos contaminantes es superior al 93% pero que al utilizar un factor de escala  $> 10$ , existe una evidente disminución (31%) en la eficiencia de remoción de los hidrocarburos. Si bien es cierto que en los experimentos con factores de escala  $> 10$  obtuvieron un nivel de remediación superior al 90% es evidente que no se conserva la eficiencia en la biorremediación reportada para los experimentos tomados como base (99%). Esto puede atribuirse principalmente a que en dichos experimentos no se tuvo un control estricto sobre el tamaño de partícula. Algunos autores (Lin y Luong, 2004; Bouffard, 2005; Sheikhzadeh *et al.*, 2005 y Mousavi *et al.*, 2006) mencionan que la distribución de diferentes tamaños de los aglomerados en las pilas de heap leaching

pueden ayudar a aumentar la eficiencia de extracción de los minerales de baja ley sí y sólo sí las tasas de recirculación de la solución lixiviante es baja, ya que de esta manera el proceso no generaría problemas de segregación de partículas dentro de la pila. Así mismo, un problema originado por el uso de un tamaño de aglomerado uniforme en el lecho empacado sería el contar un tiempo de retención demasiado bajo de la solución mineral en el empaque debido principalmente a que el espacio intra-aglomerados es similar al que ocupan en sí los aglomerados y por lo tanto el drenado de la columna se efectúa rápidamente (Decker y Tyler, 1999; O’Kane Consultants Inc., 2000). Entonces, se asume que la disminución de la eficiencia en la degradación de hidrocarburos en el sistema, es debida a una reducción en el tiempo de contacto entre la solución mineral que transporta los nutrientes y cofactores necesarios para un óptimo desarrollo de los microorganismos y el lecho empacado en el cual se encuentra fija la biomasa.

Una estrategia metodológica para el manejo de datos obtenidos en el laboratorio, es simplificar el sistema mediante una agrupación de las variables más representativas del proceso utilizando números adimensionales (Mitchell, *et al.*, 1999; Zlokarnik, 2001). El conjunto de datos obtenidos a partir del estudio de escalamiento permitió la generación de un modelo matemático basado en las relaciones existentes entre las características geométricas e hidrodinámicas del sistema y su influencia sobre la degradación de los hidrocarburos contaminantes del suelo. Para evaluar el modelo (ecuación 9) se empacaron columnas de acuerdo a lo reportado por Salinas-Martínez (2004). Los datos de degradación de hidrocarburos obtenidos fueron normalizados y graficados (Figura 9) con una  $R^2 = 0.8797$ . Así mismo, se analizó la relación entre el diámetro de partícula y el flujo volumétrico (Figura 11) observando que el ajuste (ecuación 10) en la curva obtenida produce una  $R^2 = 0.9889$ . Finalmente, se realizó una normalización de los datos (Ecuaciones 5 y 6) de cada una de las escalas probadas. En la Figura 10 se observa como los resultados se comportan de manera exponencial de acuerdo a lo señalado en la ecuación 4.

Los experimentos analizados en este documento han demostrado que es posible utilizar la técnica de biolixiviación en pila acoplada a un proceso de bioestimulación para reducir las concentraciones de los hidrocarburos en diferentes tipos suelos en un rango de un 84% y un 97%. Un análisis estadístico (Prueba de  $t_{(0.05, 9)}$  para muestras independientes) de estos experimentos mostró que no existen diferencias significativas entre ellos, a excepción del experimento con factor de escala de 18.5 del suelo 3. La disminución observada en la eficiencia de la biodegradación de los hidrocarburos (Tabla 3) puede atribuirse a la influencia de canales de flujo preferencial en el lecho empacado, lo que seguramente afecta la hidrodinámica del sistema. No obstante, estudios previos en el laboratorio muestran que no se aprecian diferencias significativas en la humedad de los cortes transversales realizados a las columnas (datos no mostrados). La presencia de los canales preferenciales de flujo propicia un flujo conocido como “Flujo de Macro-Poros”, el cual es un flujo rápido en el espacio interpartícula que ejerce muy poco poder de succión intrapartícula (Decker y Tyler, 1999; O’Kane Consultants Inc., 2000; Bouffard, 2005). Dicho flujo es uno de los principales mecanismos de transporte de nutrientes (Morra, 1998). El proceso la biodegradación de hidrocarburos reportado durante el estudio de escalamiento se realizó con un alto nivel de eficiencia, observándose que se pierde sólo el 0.9% de la misma, en 15 días de proceso, al escalar de 0.5 kg a 6.75 Kg, pero dicha eficiencia disminuye en  $\approx 33\%$  al realizarse en factores de escala  $< 10$ .

Otro tipo de estudios también ampliamente reportado a nivel internacional, son los que abordan los aspectos relacionados con los procedimientos y experiencias al realizar cambios de escala en sus procesos (Márquez-Rocha *et al.*, 2000; Geng y Gijzen 2004; Hansen *et al.*, 2004). Parte de los trabajos comúnmente realizados, son los relacionados al modelamiento matemático de datos experimentales que permiten predecir o simular un comportamiento determinado. Al comienzo de esta investigación, se determinaron el conjunto de variables que más influyen durante el proceso de biorremediación

desarrollado en el laboratorio, éstas a su vez pueden ser agrupadas como variables dinámicas, es decir, relacionadas con la hidrología del reactor. Teniendo esto en consideración, el modelo más representativo para nuestro sistema fue el número de Reynolds, ya que este engloba las características antes mencionadas. El conjunto de datos obtenidos en el laboratorio durante los estudios de escalamiento hicieron posible la generación de un modelo matemático que permite el establecimiento de las condiciones de operación mediante la predicción y reajuste de las variables involucradas. Mediante la aplicación del modelo matemático a los datos obtenidos durante el escalamiento, se genera una hipótesis del por qué la eficiencia en la degradación de hidrocarburos disminuye conforme el factor de escala se incrementa ( $< 10$  factores de escala). Esto se debe principalmente al estricto control que se tuvo sobre el tamaño de partícula en cada uno de los experimentos, cuando una combinación de diferentes diámetros de partícula en el lecho empacado proveen mejores condiciones hidrodinámicas, lo que beneficia al proceso que se desarrolle bajo dichas condiciones (Dixon and Hendrix; 1993; Mota *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). Por otro lado, Gogoi, *et al.*, 2003, desarrollaron un proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo donde evalúan la influencia de la adición de nutrientes y microorganismos en un campo de la India, obteniendo un 75% de degradación de los contaminantes en un año. Mediante la aplicación de un modelo matemático desarrollado a partir de sus datos experimentales y la simulación computalizada del proceso, explican los porqués de los niveles residuales de los hidrocarburos en el suelo. Li *et al.*, 1995, establecieron cinéticas de degradación de hidrocarburos, consumo de oxígeno y fenómenos de transferencia y biodisponibilidad de hidrocarburos. A partir de ello, crearon y validaron tres ecuaciones que les permitieron identificar el factor limitante para su proceso de biorremediación, lo que les permitió optimizarlo al reajustar las condiciones de operación en sus reactores. Finalmente, Dixon and Hendrix, 1993, generan un modelo matemático adimensional a partir de datos experimentales generados en columnas en las que analizan el efecto del tamaño de partícula sobre la eficiencia en la biolixiviación de minerales.

Si bien es cierto que no se tienen suficientes datos como para generar un modelo matemático que establezca contundentemente las relaciones existentes entre el tamaño de partícula y el tiempo de residencia de la solución nutritiva con la eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos en suelos, sí se presenta la oportunidad de continuar con estos estudios.



## CONCLUSIONES

El nivel de degradación de hidrocarburos alcanzado en los tres tipos de suelos analizados en este estudio, demuestra que la técnica de biolixiviación en pilas posee las características potenciales para ser aplicada en sistemas de biodegradación de hidrocarburos sin que las diferentes propiedades mecánicas de los suelos influyan de una manera importante sobre el proceso de biorremediación. Por otro lado, debe considerarse la química de los contaminantes (tipos y concentración) y los aspectos biológicos (número de cepas y sus capacidades metabólicas), junto con los factores geométricos y dinámicos, como los que juegan los principales papeles en la biorremediación de suelos.

El Número de Reynolds como criterio de similaridad dinámica para el escalamiento, permitió determinar las condiciones hidrodinámicas a diferentes tamaños de reactor permitiendo escalar el proceso de biolixiviación en pila aplicado para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, manteniendo su eficiencia en la remoción de contaminantes (hasta un factor de escala  $> 10$ ). Esto implica que el uso de sistemas hidrológicos insaturadas (dentro de ciertos límites, en este caso factores de escala 1-10) puede proveer las condiciones propicias para que la microbiota autóctona utilizara los hidrocarburos contaminantes del suelo como la principal fuente de carbono

y energía.

La relación existente entre la eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo y la hidrología de dicho sistema se muestra en la ecuación generada durante el desarrollo de esta investigación.

Es posible desarrollar un proceso de biorremediación de suelos mediante la combinación de técnicas biotecnológicas tales como la bioestimulación de cepas nativas de suelos contaminados y el proceso denominado como biolixiviación en pila y conseguir altos niveles ( $\approx 90\%$ ) de biodegradación de los contaminantes, así como escalar dicho proceso sin pérdidas significativas ( $< 1\%$ ) en la eficiencia del proceso.

## LITERATURA CITADA

Acevedo, F. 2000. The Use of Reactors in Biomining Processes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3 (3): 184 –194.

Acevedo F. 2002. Present and future of bioleaching in developing countries. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5(2): 196-199.

Admassu W, Korus RA. 1998. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. In: *Bioremediation Principles and Applications*, Crawford RL and Crawford DL (eds). Cambridge: United Kingdom, pp. 13-34.

Aiba, S., Humphrey, A. E., y Millis, N. F. Scale – Up. En: *Biochemical Engineering*. Academic Press. New York, 1965, pp. 163-185.

Ausma S, Grant C, Colleen E, Fitzgerald-Hubble R, Halfpenny-Mitchell L, Gillespie TJ, Mortimer WP. 2002. Volatile Hydrocarbon Emissions from a Diesel Fuel-Contaminated Soil Bioremediation Facility. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 52:769-780.

Alexander, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press: San Diego, California, pp. 1-7.

Atlas, RM. 1981. “Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective”. *Microbial Rev.* 45(1): 180-209.

Barrett J, Hughes M.N, Karavaiko G.I, Spencer P.A. 1993. Iron speciation. In: Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Minerals. Ellis Horwood Series in Inorganic Chemistry. Ellis Horwood Limited, Great Britain. Pp. 191.

Bird R.B, Stewart W.E, y Lightfoot E.N. 2002. Velocity distributions with more than one independent variable. In: Transport Phenomena. John Wiley, New York. 114 – 152.

Blackburn J.W and Hafker W.R. 1993. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. Trends in Biotechnology. 11(8): 328-333.

Boopathy R. 2003. Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. International Biodeterioration & Biodegradation 52: 161 – 166.

Borém A, Santos F.R, Bowen D.E. 2003. Bioremediation. In: Understanding biotechnology. Prentice Hall: United States of America, pp. 131-138.

Bosecker K. 1997. Bioleaching - metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiology. Reviews. 20(3-4): 591-604.

Bouffard S.C. 2005. Review of agglomeration practice and fundamentals in heap leaching. Mineral Processing & Extractive Metall. 26: 233-294.

Bouffard S.C, Dixon D.G. 2004. Heap Biooxidation of Refractory Gold Ores: current state of the art. Mineral Processing & Extractive Metall. Rev., 25: 159-192.

Bouffard S.C, y Dixon D.G. 1998. Investigative study into the hydrodynamics of heap leaching processes. Department of Metals and Materials Engineering. The University of British Columbia. Vancouver, British Columbia, Canada

Brombacher C, Bachofen R, Brandl H. 1998. Development of a Laboratory-Scale Leaching Plant for Metal Extraction from Fly Ash by *Thiobacillus* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4): 1237–1241.

Bujalski J, Tiller-Jeffery, R, Watling H, Schwarz M.P. 2003. CFD Modeling and comparison with experimental residence time distributions in single and two phase porous flows. In: Third International Conference on CFD in the Minerals and Process Industries, CSIRO, Melbourne, Australia, December, 10-12.

Cerniglia C.E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future application in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19: 324-333.

Christofi N, Ivshina I.B. 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 915–929.

Cifuentes R. 1998. Heap leach agglomeration/percolation extraction aids for enhanced gold and silver recovery. Patent Cooperation Treaty PCT/US99/10489. June 1998. World Intellectual Property Organization, International Bureau.

Cohen M.F, Williams J, Yamasaki H. 2002. Biodegradation of diesel fuel by an azolla-derived bacterial consortium. *Journal of Environmental Science and Health Part A—Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* A37(9): 1593–1606.

Cunningham C.J, Philp J.C. 2000. Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation in ex situ Treatment of Diesel Contaminated Soil. *Land Contamination & Reclamation*. 8(4): 261 – 269.

Das K y Mukherjee A.K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology* 98: 1339–1345.

De los Santos-Córdova M. (2005). Aislamiento, identificación y cinética de microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo, nativos de un suelo minero. Tesis (Tesis de Maestría en Ciencias). Instituto Tecnológico de Durango.

Decker D.L, Tyler S.W. 1999. Hydrodynamics and Solute Transport in Heap Leach Mining. In: Kosich D and Miller G (eds). Heap Leach Closure Conference, 14-15 January 99 Nevada, Reno: 1-12.

Degrève J, Baeyens J, Van de Velden M. y De Late S. 2006. Spray-agglomeration of NPK-fertilizer in a rotating drum granulator. Powder Technology 163(3): 188–195

Dixon G.D and Hendrix J.L. 1993. A Mathematical Model for Heap Leaching of One or More Solid Reactants from Porous Ore Pellets. Metallurgical Transactions B 24B: 1993-1087.

Dott W, Feidieker D, Steiof M, Beckerc PM, Ktimpera P. 1995. Comparison of *Ex situ* and *In situ* Techniques for Bioremediation of Hydrocarbon-polluted Soils. International Biodeterioration & Biodegradation. 35(1-3): 301-316.

Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri A.K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology. 59:143–152.

Edgehill Richard U. 1993. Bioremediation - The Biological, Physical, and Chemical Bases. In: Workshop on the use of Bioremediation for Oil Spill Response in the Great Barrier Reef Region, Lash J and Raaymakers S (eds). Great Barrier Reef Marine Park Authority: Townsville, Qld, pp. 20-25.

Evans G.M, Furlong J.C. 2003. Contaminated Land and Bioremediation. In: Environmental Biotechnology. Theory and Application. John Wiley & Sons Ltd: England, pp. 89-112.

Franzetti A, Di Gennaro P, Bestetti G, Lasagni M, Pitea D, Collina E. 2008. Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons-contaminated media bioremediation. *Journal of Hazardous Materials* 152: 1309–1316.

Finžgar N, Leštan D. 2006. Heap leaching of Pb and Zn contaminated soil using ozone/UV treatment of EDTA extractants. *Chemosphere*, 63(10): 1736-1743.

Flores Tavizón, E. 1998. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. Luismin S. A. de C. V.

Fritsche W and Hofrichter M. 2005. Aerobic Degradation of Recalcitrant Organic Compounds by Microorganisms. In: *Environmental Biotechnology*, Jördening HJ and Winter J (Eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, pp, 203-228.

Geankoplis C.J. 1999. Principios de movimiento lineal y balances globales. En: *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V., México, D. F. pp. 38 -129.

Geng Z, Bassi A.S, Gijzen M. 2004. Enzymatic treatment of soils contaminated with phenol and chlorophenols using soybean seed hulls. *Water, Air, and Soil Pollution* 154: 151–166.

Gogoi B.K, Dutta N.N, Goswami P, Krishna-Mohanb T.R. 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental Research* 7: 767–782.

Gumersindo F, Moreira M.T, Lema J.M. 2003. Recuperación do litoral contaminado por fuel mediante técnicas de biorremediación. *Boletín das Ciencias*, (52): 87-102.

Hamdi H, Benzarti S, Manusadžianas L, Aoyama I, Jedid N. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1926–1935.

Hansen L.D, Nestler C, Ringelberg D, Bajpai R. 2004. Extended bioremediation of PAH/PCP contaminated soils from the POPILE wood treatment facility. *Chemosphere* 54: 1481–1493.

Hanson A.T, Dwyer B, Samani Z.A, y York D. 1993. Remediation of chromium-containing soils by heap leaching: column study. *Journal of Environmental Engineering*, 119 (5): 825 – 841.

Hughes J.B, Duston K.L, Ward C.H. 2002. Engineered Bioremediation. *GWRTAC: Pittsburgh*, pp. 3-10.

Hutchinson S.L, Banks M.K, y Schwa A.P. 2001. Phytoremediation of Aged Petroleum Sludge: Effect of Inorganic Fertilizar. *Journal of Environmental Quality*. 30: 395–403.

Hwang, C.O, Given J.A, Mascagni M. 2000. On the rapid estimation of permeability for porous media using Brownian motion paths. *Physics of Fluids* 12(7): 1699-1709.

Jaramillo, J. Daniel F. 2001. La textura del suelo. En: *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Nacional de Colombia. Escuela de Geociencias. Medellín, Colombia. pp. 164-179.

Johnson P.H. 1985. Cellular heap leach process and apparatus. United States Patent. Pament Number: 4,526,615. Jul 1985. USPTO.

Jørgensen K.S, Puustinen J, Suortti A.M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107: 245-254.

Koning M, Hupe K, Stegmann R. 2005. Soil Remediation and Disposal. In: *Environmental Biotechnology*, Hans-Joachim J and Winter J. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA: Weinheim, Germany. 259-272.



Kuyukina M.S, Ivshina I.B, Ritchkova M.I, Philp J.C, Cunningham C.J,Christofi N. 2003. Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soil Using Slurry-Phase Biological Treatment and Land Farming Techniques. *Soil and Sediment Contamination*, 12(1):85-99.

Lee M, Kim M.K, Singleton I, Goodfellow M, Lee S.T. 2006. Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *Journal of Applied Microbiology* 100: 325–333.

Li KY, Zhang L, Xu T. 1995. Bioremediation of oil-contaminated soil — A rate model. *Waste Management*. 15(5-6): 335-338

Lin H.K, Luong H.V. 2004. Column Leaching for Simulating Heap and In-situ Soil Remediation with Metallic Fenton Reaction. *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering* 3(1): 33-39.

Liu S, Suflita J.M. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 11(8):344– 352.

Luna-Olvera H.A, Tamez-Guerra P, Sandoval-Coronado C, Pereyra-Alfárez B. 2003. Biorremediación. In: *Procesos biotecnológicos*, Galán-Wong LJ, Elias-Santos M, Tamez-Guerra P, Quintero-Ramírez R and Quintero-Zapata I (Eds). Universidad Autónoma de Nuevo León: N.L. México. 214-223.

Majdi A, Mehdi A, y Nasab S.K. 2007. Adequate drainage system design for heap leaching structures. *Journal of Hazardous Materials*. 147 (1-2): 288-296.

Mancera-López M.E, Esparza-García F, Chávez-Gómez B, Rodríguez-Vázquez R, Saucedo-Castañeda G, Barrera-Cortés J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61: 151–160.

Márquez-Rocha F.J., Hernández-Rodríguez V, Lamela M.T. 2000. Biodegradation of Diesel Oil in Soil by a Microbial Consortium. *Water, Air, and Soil Pollution* (128): 313–320.

Margesin R y Schinner F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56:650–663.

Masak J, Machackova J, Siglova M, Cejkova A, Jirku V. 2003. Capacity of the Bioremediation Technology for Clean-Up of Soil and Groundwater Contaminated with Petroleum Hydrocarbons. *Journal of Environmental Science and Health Part A* . A38(10): 2447–2452.

McClelland G.E, Pool D.L and Eisele J.A. 1983. Agglomeration-Heap Leaching Operations in the Precious Metals Industry. Reno, Nevada: Bureau Mines. United States Department of the Interior, (IC/8945).

Medrano Roldán H y Galán Wong L.J. *Biotecnología de minerales*. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango. Durango, México, 2000. pp. 341

Medrano Roldán H y Galán Wong L.J. Aspectos de bioingeniería en procesos biotecnológicos. En: *Procesos biotecnológicos*, Luis J. Galán Wong, Myriam Elias Santos, Patricia Támez Guerra, Rodolfo Quintero Ramirez e Isela Quintero Zapata (Editores). Universidad Autónoma de Nuevo León. 2003, pp. 21-44

Medrano Roldán H, Galán Wong L.J y Medrano Trujillo H.A. 2004. Factores técnicos y económicos en procesos biotecnológicos. En: *Biotecnología Financiera*. Instituto Tecnológico de Durango. Durango, México. Pp. 60 – 112.

Miller M.N, Stratton G.W, Murray G. 2004. Effects of nutrient amendments and temperature on the biodegradation of pentachlorophenol contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 151: 87–101.

Mitchell D.A, Pandey A, Sangsurasak P, Krieger N. 1999. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 35: 167–178.

Mohanty G y Mukherji S. 2008. Biodegradation rate of diesel range *n*-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61: 240–250.

Morra M.J. 1998. Bioremediation in soil: influence of soil properties on organic contaminants and bacteria. In: *Bioremediation Principles and applications*, Crawford RL and Crawford DL (eds). Cambridge: United Kingdom, pp. 35-60.

Mort P.R. 2005. Scale-up of binder agglomeration processes. *Powder Technology* 150: 86– 103.

Mota M, Teixeira J.A, Yelshin A. 1999. Image analysis of packed beds of spherical particles of different sizes. *Separation and Purification Technology* 15: 59-68.

Mousavi S.M, Jafarib A, Yaghmaeia S, Vossoughia M, Sarkomaab P. 2006. Computer simulation of fluid motion in a porous bed using a volume of fluid method: Application in heap leaching. *Minerals Engineering*. 19(10):1077-1083

Müezzinoğlu A. 2003. A Review of Environmental Considerations on Gold Mining and Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33(1):45–71.

Newmont. 2006. How Gold is Mined. [Internet]. Newmont mining corporation. Disponible en el sitio de red: <http://www.newmont.com/en/about/gold/howmined/index.asp>

Norma Oficial Mexicana. 2005. Limites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

Norma Oficial Mexicana. 2002. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. NOM-021-RECNAT-2000.

O’Kane Consultants Inc 2000. Demonstration of The Application of Unsaturated Zone Hydrology for Heap Leaching Optimization. Saskatoon, SK: O’Kane Consultants Inc., (Report No. 628-1)

Olson G.J, Brierley J.A, Brierley C.L. 2003. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. Applied Microbiology and Biotechnology 63:249–257.

Orrantia-Borunda E, Makita-Aguilar M.A, Acosta-Acosta A, Pereyra Alférez B, Arévalo- Gallegos S. 2000. Procesamiento biológico de minerales refractarios (y algunos aspectos sobre *Thiobacillus ferrooxidans*). En: Biotecnología de minerales, Medrano Roldán H y Galán Wong L.J. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango. Durango, México, 2000. pp. 111 – 142.

Pala D.M, De Carvalho D.D, Pinto J.C, Sant’Anna Jr G.L. 2006. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation 58: 254–260.

Pandey A, Soccol C.R y Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochemistry 35:1153–1169.

Perry R.H y Chilton C.H. 1984. Reducción y aumento de tamaño. En: Manual del ingeniero químico. Volumen II. McGraw-Hill, México. pp 8-66 – 8-65.

Porro S., Pogliani C., Donati E. y Tedesco P. 1993. Use of packed bed bioreactors application to ores bioleaching. Biotechnology Letters 15(2): 207-212.

Prince R.C. 2003. Bioremediation: An Overview of How Microbiological Processes can be applied to the Cleanup of Organic and Inorganic Environmental Pollutants. In: Encyclopedia of Environmental Microbiology, Bitton G. (Editor). John Wiley & Sons, Inc. Annandale, New Jersey. Pp. 3527.

Pyper R, Morrissey C, Middleditch L. 1999. Heap Leaching: Simple – Why not successful? In: The 1999 Parker Centre Hydrometallurgy Conference - Leaching Science and Technology: Current Status and Future Directions, 10-12 October 1999. Australia. Session 4 Paper 2 pp. 9.

Rennie, R. J. 1981 A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Canadian Journal of Microbiology. 27: 8–14.

Rivera-Rojas A.C. (2005). Determinación de la influencia de la relación de una mezcla de arena y suelo en las propiedades hidrológicas en una columna de heap leaching. Residencia. (Residencia de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Durango.

Rubin H, Narkis N. 2001. Feasibility of on-site bioremediation of loam soil contaminated by diesel oil. Journal of Environmental Science and Health, Part A. A36(8): 1549–1558.

Ryan J.R. 1991. Bioremediation of organic contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, 28: 159-169.

Sabaté J, Viñas M, Solanas A.M. 2004. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. International Biodeterioration & Biodegradation 54: 19 – 25.

Salcido-Hernández S. (2004) *Biodegradación de Diesel mediante un cultivo mixto*. Tesis. (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de Durango.

Salinas-Martínez A. (2004) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo mediante el uso de la técnica de Heap Leaching. Tesis (Maestría en Ciencias). Instituto Tecnológico de Durango.

Salinas-Martínez, A, De los Santos-Córdova M, Soto-Cruz O, Delgado E, Pérez-Andrade H, Háuad-Marroquín L.A, Medrano-Roldán H. 2007. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. [Internet]. Journal of Environmental Management, Disponible en el sitio de red: doi:10.1016/j.jenvman.2007.01.038 (In press)

Saucedo-Castañeda G. Favela-Torres E y Gutiérrez-Rojas M. Desarrollo de Criterios de Escalamiento de Biorreactores de Fermentación en Medio Sólido. En: Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería, Galindo Enrique (Editor), Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. México. 1996, pp. 365-374

Saval Susana. 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con Diesel por estimulación de la microflora autóctona. En: FEMISCA A.C. (Ed.) XI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Zacatecas, Zacatecas. Noviembre 4-7.

Schmidt W. 2001. Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) 1-7.

Schulz-Berendt V. 2005. Bioremediation by the Heap Technique. In: Environmental Biotechnology, Jördening HJ and Winter J (Eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, pp, 275-286.

Semple, K.T, Reid, B.J and Fervor, T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environmental Pollution, 112 (12): 269-283.

Sheikhzadeh G.A, Mehrabian M.A, Mansouri S.H, Sarrafi A. 2005. Computational modelling of unsaturated flow of liquid in heap leaching—using the results of column tests to calibrate the model. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 48: 279–292.

Stroud J.L, Paton G.I, Semple K.T. 2007. Importance of chemical structure on the development of hydrocarbon catabolism in soil. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 272: 120–126.

Rittmann B.E, McCarty P.L. 2001. Bioremediation. In: *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, George Tchobanoglous (Ed). McGraw Hill: New York. 695-728.

Thiel R, Smith M.E. 2004. State of the practice review of heap leach pad design issues. *Geotextiles and Geomembranes* 22(6): 555–568

Toledo F.L, Calvo C, Rodelas B, González-López. 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 244–252.

Turlough F.G. 2001. Co-Composting of Residual Fuel Contamination in Soil. *Soil and Sediment Contamination*, 10(6):659-673.

US EPA. 1996. n-hexane extractable material (HEM) for sludge, sediment, and solid samples. EPA/SW/846/9071b

US EPA. 1996. Soxhlet extraction. EPA/ SW/846/3540c

Vaccari D.A, Strom P.F, Alleman J.E. 2006. Biological Applications for Environmental Control. In: *Environmental Biology for Engineers and Scientists*. John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, New Jersey, pp. 577-703.

Van Deuren, J., Wang, Z., Ledbetter, J., 1997. Remediation technologies screening matrix and reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office , EPA. [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Viñas-Canals M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.

Velarde G. 2005. Agglomeration control for heap leaching processes. Mineral Processing & Extractive Metall. Rev., 26: 219–231.

Volke-Sepúlveda T. y Velasco-Trejo J.A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT. México, pp 51-54.

Von der Weid I, Marques J.M, Cunha C.D, Lippi R.K, Dos Santos S.C.C, Rosado A.S, Lins U, Seldin L. 2007. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamomea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. Systematic and Applied Microbiology 30: 331–339.

Wackett L.P, Hershberger C.D. 2001. Predicting Microbial Biocatalysis and Biodegradation. In: Biocatalysis and Biodegradation. Microbial transformation of organic compounds. ASM Press: Washington, D.C. 157-168.

Whiteley A.S y Bailey M.J. 2000. Bacterial community structure and physiological state within and industrial phenol bioremediation system. Applied and Environmental Microbiology. 66(6): 2400-2407.

Zlokarnik M. 2001. Dimensional analysis and scale-up in theory and industrial application. Journal of Liposome Research, 11(4): 269–307.



Zytner R.G, Salb A.C, Stiver W.H. 2006. Bioremediation of Diesel Fuel Contaminated Soil: Comparison of Individual Compounds to Complex Mixtures. *Soil & Sediment Contamination*, 15:277–297.